GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON N,N-DIMETHYLAMINOSÄUREESTERN

Hildegard Popp-Ginsbach

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0022

GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON N,N-DIMETHYLAMINOSÄUREESTERN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hildegard Popp-Ginsbach

aus Sehndorf

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung : 2. Mai 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Theodor Severin

am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Für seine großzügige Unterstützung und stets wohlwollende Hilfe möchte ich Herrn Professor Severin meinen herzlichen Dank aussprechen.

Frau I. Stekker möchte ich für die Anfertigung der NMR-Spektren und der Elementaranalysen sowie Herrn Dr. Lerche für die hilfsbereite Unterstützung bei der Aufnahme und Interpretation der Massenspektren danken.

Meinen Eltern

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Theoretischer Teil :		
I.	Einleitung	1
II.	Methylierung von Aminosäureestern mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid	18
III.	Gaschromatographische Analyse von Aminosäuren als N,N-Dimethylaminosäurebutylester und O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylester	35
IV.	Gaschromatographische Analyse von Aminosäuren als N,N-Dimethylaminosäurebutylester und N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäure-butylester	44
V.	Darstellung der N,N-Dimethylderivate von biogenen Aminen	50
VI.	Derivatisierung von Dipeptiden mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid	56
VII.	Aminosäureanalyse in Lebensmitteln	78
VIII.	Umsetzung von Isomaltol mit Lysin	112
IX.	Trennung von Aminosäuren als 2,4-Dinitrophenyl-derivate mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographie (HPLC)	130

X. Zusammenfassung und Diskussion 139

XI. Literaturverzeichnis 143

Experimenteller Teil :

A. Herstellung und gaschromatographische Trennung von N,N-Dimethylaminosäurebutylestern 150

B. Herstellung und gaschromatographische Trennung von O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylestern 151

C. Herstellung und gaschromatographische Trennung von N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylestern. 152

D. Herstellung der N,N-Dimethylderivate von biogenen Aminen 153

E. Derivatisierung von Dipeptiden mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid 154

F. Aminosäureanalyse in Lebensmitteln 155

G. Umsetzung von Isomaltol mit Lysin 164

E. Herstellung von 2,4-Dinitrophenylaminosäuren und ihre Trennung mittels HPLC 169

Theoretischer Teil

I. Einleitung

Proteine sind neben Kohlenhydraten und Fetten Hauptbestandteile unserer Nahrung. Ihre Bedeutung liegt aber nicht wie bei jenen in der Rolle einer Energiequelle für den Organismus, sie ist eine spezifischere : Die Eiweißstoffe liefern Bau- und Ersatzmaterial für Blut- und Zellplasma, Zellkerne und Intercellulärsubstanz; sie sind unentbehrlich für die Synthese von Enzymen, Hormonen und Antikörpern. Denkt man noch an die zahlreichen zusammengesetzten Eiweißstoffe, die eine nichteiweißartige "prosthetische" Gruppe enthalten und zu denen z.B. der eisenhaltige Blutfarbstoff und die für die Vererbung verantwortlichen Gene der Chromosomen als Nucleoproteide gehören, so wird die überragende Rolle der Proteine bei den Lebensvorgängen deutlich.

Durch das unterschiedliche Angebot an Proteinen in unserer Nahrung werden dem Körper die darin enthaltenen Aminosäuren in unterschiedlicher Menge zugeführt. Einen Teil der zur Eiweißsynthese dienenden Aminosäuren kann sich der Organismus für seinen Bedarf selbst aus den Nahrungsstoffen aufbauen. Andere müssen regelmäßig, in genügender Menge, in bestimmter Relation und dann gleichzeitig dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden. Es sind dies die essentiellen Aminosäuren. Tierische Proteine sind biologisch wertvoller als pflanzliche, weil sie einen höheren Gehalt und ein dem menschlichen Körpereiweiß entsprechendes Mengenverhältnis an essentiellen Aminosäuren haben.

Die Bedeutung optimaler Eiweißversorgung, insbesondere der Versorgung mit essentiellen Aminosäuren, zwingt dazu, der chemischen Zusammensetzung von Proteinen, sowie dem Verhalten von Eiweißstoffen bei der Gewinnung und Zubereitung von Lebensmitteln besonderes Interesse zu schenken.

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen stehen verschiedene Analysenmethoden zur Verfügung. Biochemiker und Mediziner entwickelten empfindliche Verfahren, die auch bei der Untersuchung von nur in kleinen Mengen vorkommenden körpereigenen Eiweißstoffen z.B. von Enzymen anwendbar sind.

Um die spezifische Wirkungsweise von Enzymen klären zu können, muß neben der Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren in einem Eiweißmolekül auch die Aminosäuresequenz geklärt werden.

F. Sanger entwickelte eine Methode zur "Endgruppenbestimmung" in Peptiden. Er setzte die endständige Aminogruppe in Peptiden mit 2,4-Dinitrofluorbenzol um. Die hierbei eingeführte Markierungsgruppe bleibt bei der Hydrolyse erhalten. Das Hydrolysat enthält eine Dinitrophenylaminosäure, die leicht identifiziert werden kann. Mit Hilfe seines Reagenzes und anderer Methoden gelang Sanger die Sequenzanalyse des Insulinmoleküls. Seine Arbeiten auf diesem Gebiet wurden 1958 mit dem Nobelpreis für Chemie honoriert [1].

Der systematische Abbau von Peptidketten gelang Edman [2]. Die freie Aminogruppe des Peptids wird mit Phenylisothiocyanat zur Reaktion gebracht; das entstehende Derivat spaltet bei saurer

Reaktion den endständigen Rest als Phenylthiohydantoin ab, das z.B. durch Chromatographie identifiziert werden kann. Mit dem Restpeptid wird die Reaktion wiederholt; dadurch ist es möglich, vom Aminoende her Aminosäure um Aminosäure abzubauen. Mit diesem Prinzip arbeitet eine automatische Apparatur zur Bestimmung der Reihenfolge von Aminosäuren in Peptiden, der sogenannte "Sequencer".

Während die Sequenzanalyse in der Biochemie sehr wichtig ist, kommt in der Lebensmittelchemie der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren eine größere Bedeutung zu. Hier interessiert der Gehalt eines Nahrungsmittels an verschiedenen, speziell an essentiellen Aminosäuren, um seinen Nährwert beurteilen zu können. Die Sequenz der Aminosäuren ist weniger bedeutend, da die Proteine im Körper ohnehin enzymatisch gespalten werden.

Moore und Stein wandten zur Aminosäureanalyse die Ionenaustauscher-Chromatographie an [3]. Die verwendeten Ionenaustauscherharze enthalten saure Gruppen ($-SO_3H$ oder -COOH), an denen ein Austausch von H^+ und Aminosäurekationen stattfindet, so daß auf der Säule Salze der Aminosäuren vorliegen. Durch Pufferlösungen mit steigendem pH werden die Aminosäuren nacheinander von der Säule eluiert und das Eluat fraktionsweise in aliquoten Teilen aufgefangen. In den einzelnen Fraktionen werden durch quantitative Ninhydrinreaktion die Aminosäuren bestimmt. Während zunächst die Analysen nach diesem Verfahren mehrere Tage dauerten, gelang es durch wesentliche Verbesse-

rungen, die Analysenzeit auf 20 Stunden zu reduzieren. Der Ablauf der Analyse wurde dabei voll automatisiert (Aminosäure-Analyser). Der Austausch an der Säule konnte durch Herabsetzung der Austauscher-Korngröße und durch Erhöhung der Arbeitstemperatur beschleunigt werden. Das Eluat wird kontinuierlich mit Ninhydrinlösung gemischt. Nach Erwärmung im Wasserbad passiert das Reaktionsgemisch eine Photozelle, in der die Extinktion automatisch gemessen wird. Diese wird mit einem Schreiber registriert. Zur Identifizierung der Peaks werden Aminosäuren eines Standardgemisches analysiert und die Retentionszeiten mit denen der Probenkomponenten verglichen.

Zahlreiche Literaturstellen bezeugen die mannigfaltige Anwendung der Ionenaustauscher-Chromatographie in der Lebensmittelanalytik. Als Beispiele seien die quantitative Bestimmung von freien und gebundenen Aminosäuren in verschiedenen Früchten durch Drawert [4] und die Untersuchung von Joghurt auf Aminosäuren durch Rasic [5] angeführt.

In der Qualitätskontrolle kommt den Aminosäuren eine besondere Aufgabe zu. Sie können Hinweise auf die Verdorbenheit eines Lebensmittels oder auf das Vorliegen eines verfälschten Produktes geben. Trommsdorff [6] erarbeitete ein Verfahren unter Einsatz der Ionenaustauscher-Chromatographie, um Aminosäuren zur Qualitätskontrolle von Fischen heranzuziehen. Durch die relativen Verschiebungen innerhalb des Aminosäurespektrums des Alkoholextraktes von Magerfischfleisch kann man den Zustand des Verdorbenseins erfaßen.

Den Nachweis einer Verfälschung von Orangensäften beschreibt ten Broeke [7]. Die Aminosäuren werden mit Hilfe eines Aminosäure-Analysers quantitativ bestimmt und die Werte mit denen anderer Orangensäfte verglichen. Ungewöhnlich hohe Werte für eine bestimmte Aminosäure deuten auf eine Verfälschung hin. Häufig wurde Glycin dem verdünnten Orangensaft zugesetzt. Es ist relativ billig und diese Verfälschung ist bei der Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs und bei Ermittlung der Formolzahl nicht erkennbar.

Der große Zeitaufwand für die Aminosäure-Analyse mittels Ionenaustauscher-Chromatographie wird als Nachteil dieser Methode angesehen. Zu der reinen Analysenzeit von ca. 20 Stunden muß noch die Zeit für die Regeneration der Ionenaustauscher-Säule nach jeder Bestimmung gerechnet werden. Um die getrennten Aminosäuren identifizieren zu können, wird ein bekanntes Aminosäurengemisch untersucht und die Retentionszeiten verglichen. Verfälschungen des Resultats können auftreten, wenn andere ninhydrinpositive Substanzen oder Verbindungen, die bei der gleichen Wellenlänge absorbieren wie der Ninhydrinfarbstoff, in der Probe enthalten sind. Bedenkt man noch den Preis eines Aminosäure-Analysers, so wird man verstehen, daß in vielen Labors für die Aminosäureanalyse die schnellere und billigere Gaschromatographie der Ionenaustauscher-Chromatographie vorgezogen wird.

Vorteile gegenüber bestehenden Methoden hat die Gaschromatographie wegen ihrer Empfindlichkeit und Schnelligkeit vor allem bei speziellen Problemen gezeigt, wie z.B. bei der

Analyse seltener Aminosäuren und beim Spurennachweis mit selektiven Detektoren. Während der Aminosäure-Analyser speziell der Bestimmung von Aminosäuren dient, kann ein Gaschromatograph bei verschiedenen analytischen Aufgaben eingesetzt werden. Die Kombination von Gaschromatograph und Massenspektrometer bietet zudem die Möglichkeit, unbekannte Substanzen zu identifizieren.

Aminosäuren sind wegen ihrer geringen Flüchtigkeit nur als Derivate der gaschromatographischen Analyse zugänglich. Es wurden verschiedene Wege beschrieben, um zu flüchtigen Aminosäurederivaten zu kommen :

1. Bildung von flüchtigen Derivaten durch Abbaureaktionen
2. Umsetzung zu cyclischen Produkten
3. Einführung von Schutzgruppen für die polaren funktionellen Gruppen

Die Versuche zur Bildung flüchtiger Abbauprodukte haben zu keinem allgemein brauchbaren Ergebnis geführt. Nach den beschriebenen Methoden können meist nur einige Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Umsetzung von Aminosäureestern mit Lithium-Aluminium-Hydrid z.B. führt zur Reduktion der Carboxylfunktion. Man erhält Aminoalkohole [8]. Die Polarität dieser Verbindungen ist relativ groß und es sind nur die Derivate mit niedrigem Molekulargewicht flüchtig und gaschromatographisch erfaßbar. Bei weiterer Derivatisierung der Aminoalkohole, etwa mit Trifluoracetanhydrid, wird die Zahl der bestimmbaren Aminosäuren größer, die Analyse aber auch aufwendiger.

Andere Abbaureaktionen liefern ebenfalls nur bedingt gaschromatographierbare Produkte. Dazu zählen die α-Hydroxycarbonsäureester. Sie werden bei der Behandlung von Aminosäuren mit Salpetriger Säure erhalten [9]. Die anschließende Methylierung gibt die entsprechenden Ester.

Unbefriedigende Ergebnisse liefert auch die Behandlung von Aminosäuren mit einem Gemisch aus Salzsäure und Salpetersäure [10]. Einige Aminosäuren können so in die α-Chloraminosäuren übergeführt werden, die nach Veresterung gaschromatographisch untersucht werden. Es sind dies Glycin, Alanin, Valin und Leucin. Andere Aminosäuren bilden bei dieser Umsetzung mehrere Produkte oder geben im Gaschromatogramm keinen Peak.

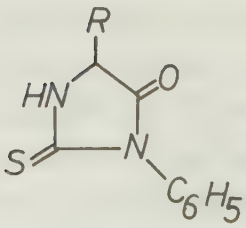
Die von der Ionenaustauscher-Chromatographie her bekannte Ninhydrinreaktion wurde auch zur gaschromatographischen Aminosäureanalyse eingesetzt [11]. Der bei der Umsetzung entstehende Aldehyd wird einer gaschromatographischen Bestimmung unterworfen. Allerdings sind die Aldehyde vieler Aminosäuren schwerflüchtig. Zudem sind sie im vorliegenden alkalischen Milieu sehr reaktiv, so daß Nebenreaktionen auftreten und eine quantitative Erfaßung nicht möglich ist. Eine weitere Schwierigkeit bei diesem Verfahren ist die Isolierung der Aldehyde aus dem Reaktionsgemisch. Die Umsetzung findet im schwach alkalischen wässrigen Milieu statt. Bei Extraktion der wässrigen Lösung mit organischen Lösungsmitteln gehen Ninhydrin, der entstandene Farbstoff und andere Kondensationsprodukte in die organische Phase. Die meisten dieser Verbindungen sind hochmolekular und im Gaschromatographen nicht

flüchtig. Sie können zu einer Verschmutzung der Säule führen.

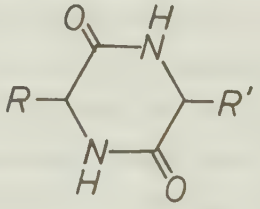
Ich versuchte mit dieser Methode den Aldehyd von Histidin herzustellen. Dies gelang mir nicht. Der aus Phenylalanin erhaltene Aldehyd konnte gaschromatographisch bestimmt werden. Die quantitative Analyse ergab, daß nur 40% des primär entstandenen Aldehyds erfaßt wurden.

Bei der Pyrolyse-Gaschromatographie werden die zu untersuchenden Proben durch Hitzeeinwirkung gespalten und die Spaltprodukte gaschromatographisch registriert [12]. Die Durchführung dieser Methode ist einfach und es werden nur geringe Substanzmengen benötigt. Wegen der ungenügenden Reproduzierbarkeit ist sie zur Analyse komplexer Gemische und für die quantitative Analyse ungeeignet.

Unter den cyclischen Derivaten, die zur gaschromatographischen Aminosäureanalyse herangezogen werden, haben nur die Phenylthiohydantoine 1 und die Diketopiperazine 2 eine gewissen Bedeutung erlangt.



1

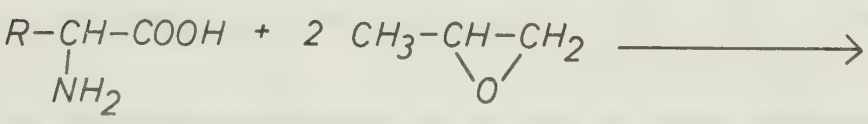


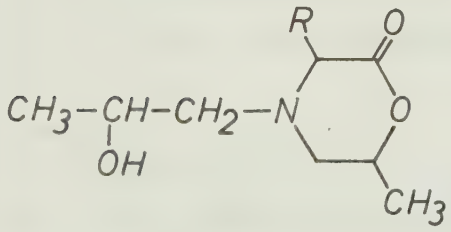
2

Interessant sind die Phenylthiohydantoine (PTH), weil sie beim stufenweisen Edman-Abbau von Peptiden gebildet werden. Nur die PTH einiger Aminosäuren sind direkt gaschromatographierbar, andere müssen erst silyliert oder trifluoracetyliert werden [13].

Diketopiperazine spielen ebenfalls in der Sequenzanalyse von Peptiden eine Rolle, da sie als Nebenprodukt bei der Partialhydrolyse entstehen und zum Teil gaschromatographisch erfaßt werden [14]. Aufgrund ihrer Polarität sind auch diese cyclischen Verbindungen nicht allgemein für die Gaschromatographie geeignet. Nur die Derivate niedermolekularer Aminosäuren können gaschromatographisch untersucht werden.

Coussement und Renard [15] führten Aminosäuren durch Umsetzung mit Propylenoxid in 2-Morpholone 3 über und trennten diese mit Hilfe der Gaschromatographie.

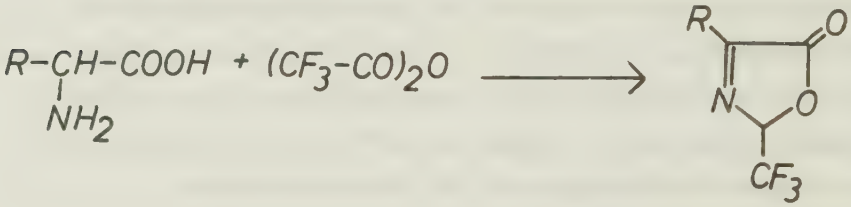




3

Allerdings geben nur die einfachen Aminosäuren einen Peak im Gaschromatogramm. Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen liefern mehrere Peaks.·

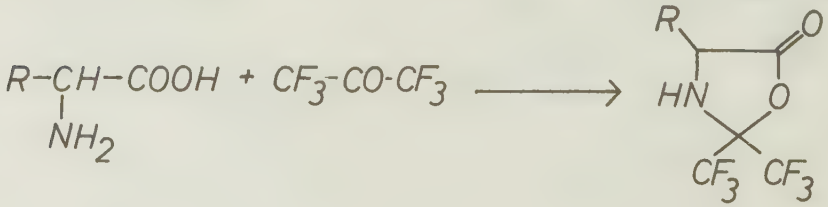
Bei einer Reihe von Aminosäuren gelangt man durch Einwirkung von Trifluoressigsäureanhydrid zu den 2-Trifluormethyl-4-alkylpseudoxazol-5-onen 4 [16].



4

Sie sind gut gaschromatographierbar, bilden sich jedoch nicht quantitativ und von einigen Aminosäuren sind diese Derivate nicht zugänglich, z.B. von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin und Methionin.

Eine andere Gruppe von relativ flüchtigen Heterocyclen erhält man durch Umsetzung der freien Aminosäuren mit Hexafluoraceton. Es sind dies die 2,2-Bistrifluormethyl-4-alkyl-1,3-oxazolidinone-(5) 5.



5

Einige Aminosäuren reagieren nicht quantitativ.

Insgesamt waren die Bemühungen, mit Hilfe von cyclischen Derivaten eine Methode zur gaschromatographischen Aminosäureanalyse zu entwickeln, nur teilweise von Erfolg gekrönt. Denn die beschriebenen Derivate eignen sich nur zur Bestimmung einer begrenzten Zahl von Aminosäuren. Bei verschiedenen Aminosäuren verläuft die Umsetzung nicht quantitativ oder aber die Verbindungen sind für die Gaschromatographie zu schwerflüchtig.

Erfolgreicher waren Versuche, Schutzgruppen für die verschiedenen funktionellen Gruppen einzuführen. Für eine reproduzierbare quantitative Aminosäureanalyse ist eine vollständige Derivatisierung aller funktionellen Gruppen notwendig, um Nebenreaktionen auszuschließen. Die Umsetzung aller funktionellen Gruppen in einem einzigen Reaktionsschritt ist zwar wünschenswert, läßt sich aber nicht in jedem Fall durchführen. Meist werden zwei Reaktionsschritte angewendet, nämlich zunächst Veresterung der Carboxylgruppe und anschließend Derivatisierung der übrigen funktionellen Gruppen. Sehr oft erfolgt der Schutz der funktionellen Gruppen durch Acylierung. Die aufgeführte Reihenfolge der Reaktionsschritte ist vorteilhaft. Bei umgekehrter Reihenfolge können einige O-Acyl- und S-Acyl-Gruppen durch Alkohol wieder abgespalten werden. Zur Veresterung müssen dann das Lösungsmittel und das überschüssige Acylierungsreagenz entfernt werden. Dadurch erfolgt eine kurzzeitige Konzentrierung des Acylierungsmittels mit der Möglichkeit zur teilweisen Bildung von N-Diacylderivaten, wodurch für eine Aminosäure im Gaschromatogramm zwei

Peaks auftreten können.

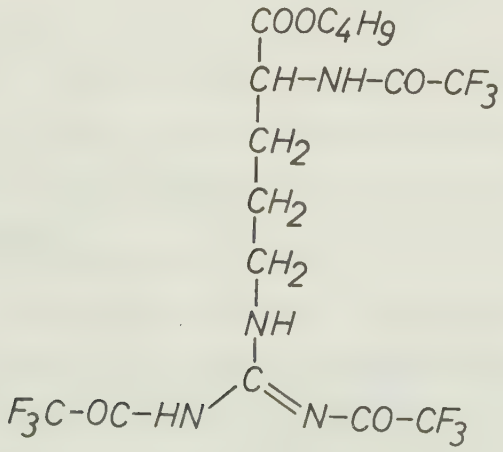
Bei den bekannten Methoden zur Derivatisierung der Aminosäuren werden die Carboxylgruppen ausnahmslos durch Veresterung geschützt. Man verwendet in erster Linie Alkylester bis einschließlich der Amylester sowie Trimethylsilylester. Als erste wurden die Methylester zur gaschromatographischen Aminosäuretrennung herangezogen [18]. Ihre hohe Flüchtigkeit kann jedoch bei der Probenvorbereitung zu Verdampfungsverlusten führen. Daher werden die Ester höherer Alkohole bevorzugt eingesetzt.

Zur Umsetzung der α-Aminogruppe und der übrigen funktionellen Gruppen haben sich Acylverbindungen besonders bewährt. Die Acylierung erfolgt meist mit den entsprechenden Anhydriden, z.B. mit Acetanhydrid oder mit Trifluoracetanhydrid.

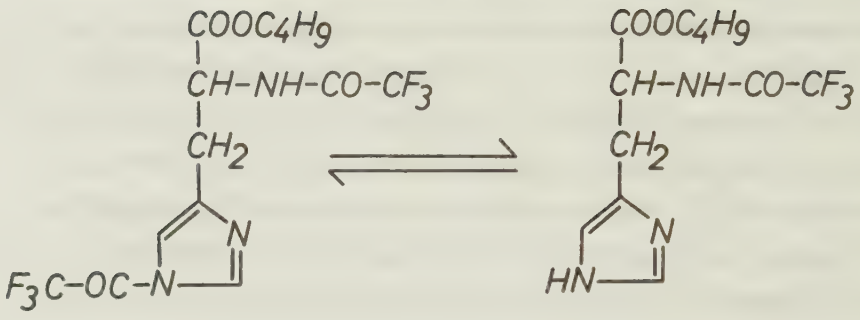
Die vollständige Acetylierung von Aminosäuren mit Acetanhydrid / Pyridin beschreiben Coulter und Hann [19]. Die Reaktion verläuft quantitativ in 5 Minuten bei Raumtemperatur. Lediglich die Umsetzungen mit Histidin und Arginin waren nicht zufriedenstellend. Die Guanidinogruppe des Arginins konnte nicht acetyliert werden. Beim Histidin bereitet die Acetylierung des Imidazolrings Schwierigkeiten.

Gehrke und Mitarbeiter beschäftigten sich intensiv mit der Trifluoracetylierung von Aminosäureestern und der gaschromatographischen Trennung der entstandenen Derivate [20]. Die beschriebene Derivatisierung verläuft quantitativ. Nur Histidin und Arginin können nicht befriedigend erfaßt werden. Sowohl der Imidazolring als auch die Guanidinogruppe liegt nach der

Veresterung als Hydrochlorid vor. Während bei Zimmertemperatur das Dihydrochlorid des Argininesters nicht mit Trifluoressigsäureanhydrid reagiert, soll unter den von Gehrke genannten Derivatisierungsbedingungen (150°C / 5 Minuten im geschlossenen Gefäß) Umsetzung zum Tri-Trifluoracetylargininbutylester 6 stattfinden [21]. Histidin soll unter diesen Bedingungen den Di-Trifluoracetylhistidinbutylester 7 bilden. Allerdings ist diese Verbindung sehr hydrolyseempfindlich, die Trifluoracetylgruppe am Imidazolring wird leicht abgespalten und es entsteht das Mono-Trifluoracetylprodukt 8. Beide Produkte sind gaschromatographierbar. Um Histidin quantitativ bestimmen zu können, muß es in ein einheitliches Derivat übergeführt werden. Dazu sind zwei Möglichkeiten beschrieben worden. Einmal



6



7 8

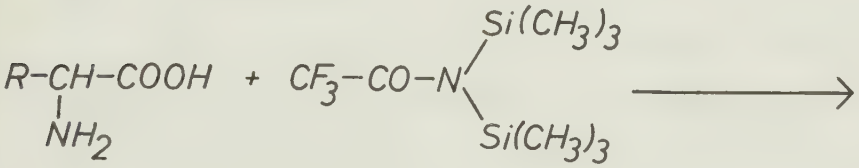
wird Trifluoracetanhydrid nach der Probe auf die Säule gespritzt [22]. Hierdurch wird Mono-Trifluoracetylhistidinester vollständig in das Diacylprodukt übergeführt. Man kann aber auch nach der Probenaufgabe n-Butanol nachspritzen. Es bildet sich dann auf der Säule das Monoacylderivat [23].

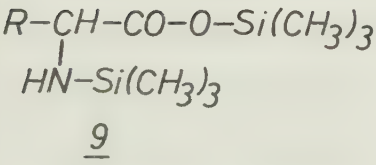
Die Problematik der Bestimmung von Histidin und Arginin wurde in der Literatur heftig diskutiert. Während Zumwalt, Kuo und Gehrke diese Aminosäuren in synthetischen Gemischen quantitativ wiederfinden [24], erhalten andere Autoren nur unbefriedigende Ergebnisse bei der Bestimmung von Arginin und insbesondere von Histidin [25]. Hierfür sind die chemischen Eigenschaften des Imidazolrings verantwortlich. Er neigt zur Bildung nichtflüchtiger Salze mit Trifluoressigsäure. Seine Acylderivate spalten sehr leicht die Acylgruppe ab, weshalb sie auch Verwendung als Acylierungsmittel finden.

Zum selektiven Nachweis von Aminosäuren bzw. bei der Analyse geringer Mengen mit Hilfe eines Elektronen-Einfang-Detektors

werden auch andere elektronegative Acylgruppen eingeführt, z.B. die Heptafluorbutyrylgruppe [26] oder eine α-Chloralkylgruppe [27]. Heptafluorbutyrylderivate zeigen eine höhere Flüchtigkeit als z.B. die Trifluoracetylverbindungen. Dies kann vorteilhaft sein bei der Analyse schwerflüchtiger Substanzen wie z.B. Peptidderivaten, insbesondere bei der direkten GC/MS-Kopplung [28].

In einem einzigen Reaktionsschritt gelingt die Derivatisierung durch Silylierung. Es entstehen dabei die N(O,S)-Trimethylsilylaminosäuretrimethylsilylester 9 [29].





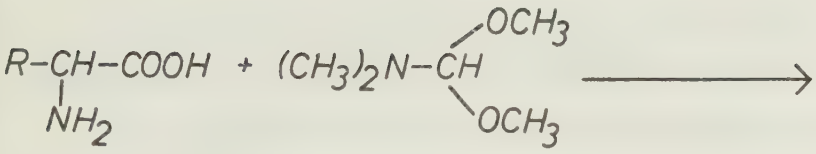
9

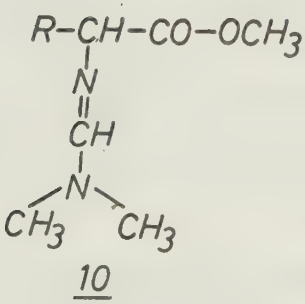
Aus der Vielzahl der angebotenen Silylierungsmittel finden N,O-Bis-Trimethylsilyl-acetamid und N,N-Bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid universelle Anwendung.

Klebe, Finkbeiner und White [30] konnten 22 Aminosäuren als silylierte Derivate trennen. Zur quantitativen Aminosäureanalyse

sind vergleichsweise drastische Bedingungen notwendig. Die Probe wird 2,5 Stunden im geschlossenen System auf 150°C erhitzt. Bei diesen Reaktionsbedingungen durchgeführte Vergleichsanalysen von Ribonuclease, β-Casein und Blut ergaben gute Übereinstimmungen mit der Ionenaustauscher-Methode [31]. Sterisch nicht abgeschirmte Aminogruppen wie bei Glycin und Lysin reagieren teilweise zu N-Bis-Trimethylsilylderivaten. Der Imidazolring im Histidin wird nur zum Teil silyliert und die Guanidinogruppe im Arginin gibt ein Monosilyl- und ein Disilylprodukt. Nachteilig ist auch die Empfindlichkeit der Derivate gegenüber Feuchtigkeit, so daß mit trockenen Substanzen und einem Überschuß an Silylierungsmittel gearbeitet werden muß. Besonders leicht wird das Histidinderivat hydrolysiert. Die gaschromatographische Trennung der Trimethylsilyl-aminosäuren gelingt nur auf Siliconphasen; auf polaren Phasen wie z.B. Polyestern und Polyglykolen wurden Zersetzungen festgestellt [32].

Thenot und Horning [33] setzten Aminosäuren mit N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal um und erhielten N,N-Dimethylaminomethylenaminosäuremethylester 10. Die Carboxylgruppe und die Aminofunktion werden in einem Reaktionsschritt derivatisiert. HO- und HS-Gruppen reagieren nicht; sie müssen zur gaschromatographischen Bestimmung der entsprechenden Aminosäuren mit anderen Reagenzien umgesetzt werden.





10

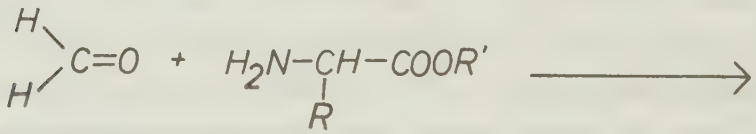
Die aufgeführte Auswahl der Methoden zur Aminosäurederivatisierung zeigt, daß dem Chemiker viele Möglichkeiten zur gaschromatographischen Bestimmung von Aminosäuren zur Verfügung stehen. Welches Verfahren angewandt wird, muß bei jedem einzelnen Problem entschieden werden. Es müssen dabei folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden : Die Reaktionen zur Derivatisierung sollen schnell und quantitativ erfolgen und möglichst in einem Reaktionsgefäß durchführbar sein. Auch die apparativen Voraussetzungen müssen beachtet werden. Steht ein Elektronen-Einfang-Detektor zur Verfügung, so wird man zum empfindlichen Aminosäurenachweis elektronegative Gruppen einführen. Nicht zuletzt sollte man darauf achten, daß die gaschromatographische Trennung der interessierenden Aminosäurederivate gut ist. Dies ist besonders bei der Analyse komplexer Aminosäuregemische wichtig.

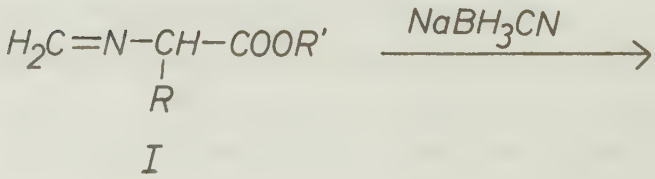
II. Methylierung von Aminosäureestern mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid

In unserem Arbeitskreis wurde bei Untersuchungen über Umsetzungen in erhitzten Lebensmitteln ein einfaches Verfahren zur Umwandlung von Aminosäuren bzw. ihrer Reaktionsprodukte mit Zuckern in leicht flüchtige Derivate gesucht. Bei Verbindungen unbekannter Struktur sollte die Derivatisierung eine Interpretation der verschiedenen Spektren (MS, IR, NMR) möglichst erleichtern. So ergab sich u.a. das Problem, Reaktionsprodukte reduzierender Zucker mit peptidgebundenem Lysin zu analysieren.

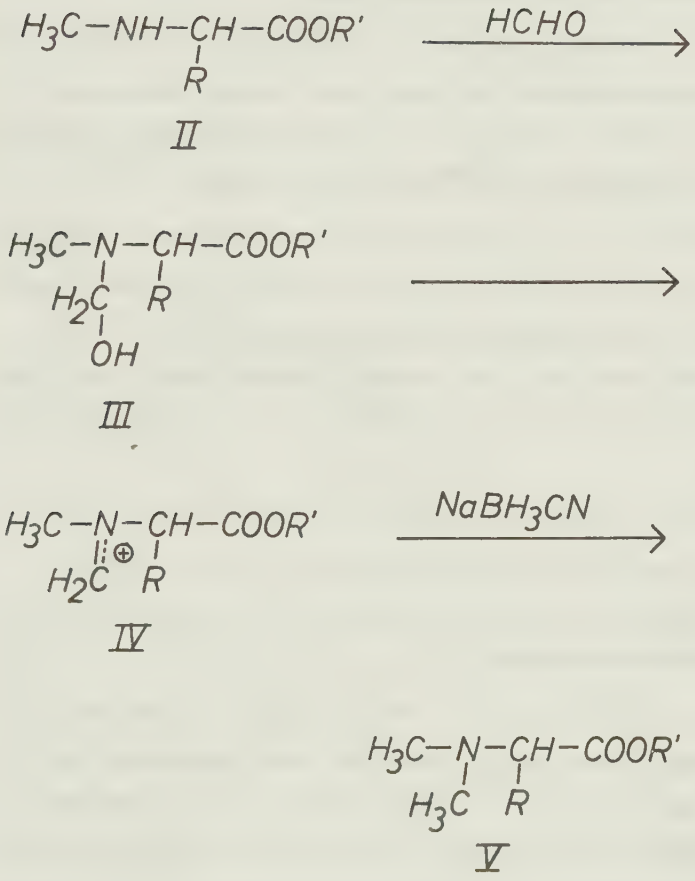
Aus der präparativen organischen Chemie ist bekannt, daß Amine mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid methylierbar sind [34]. Ich setzte auf diese Weise Aminosäuremethylester (und -butylester) zu N,N-Dimethylderivaten um.

Der Mechanismus dieser Methylierung läßt sich folgendermaßen wiedergeben :





I



Die Umsetzung von Formaldehyd mit der Aminogruppe führt zu einem Azomethin I, das mit Natriumcyanoborhydrid zum N-Methylprodukt II reduziert wird. Im nächsten Reaktionsschritt addiert sich ein weiteres Molekül Formaldehyd an die Aminogruppe. Es entsteht die N-Methyl-N-Methylolverbindung III, die in das Carbonium-Immonium-Ion IV übergeht. IV läßt sich mit Natrium-

cyanoborhydrid zum N,N-Dimethylderivat.

Schon früher behandelte Bowman [35] Aminosäuren mit Formaldehyd in Wasserstoffatmosphäre und stellte so N,N-Dimethylaminosäuren her. Dieses Verfahren ist apparativ aufwendig und zeitraubend. Die Reaktion dauert bis zu 12 Stunden.

Mit Diazomethan wird die Aminogruppe der Aminosäuren permethyliert [36]. Auch andere Alkylierungsmittel wie Alkyljodide und Dimethylsulfat lassen sich nicht zur Darstellung von Aminosäurederivaten mit definierter niederer Anzahl von Alkylgruppen heranziehen. Sie führen ebenfalls zu permethylierten Produkten.

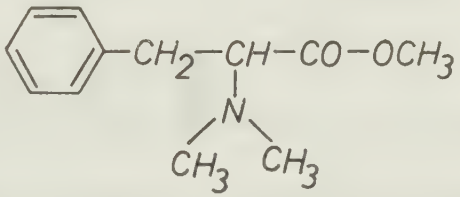
In neuerer Zeit gelang die N-Methylierung von Aminen mit Formaldehyd und Tetracarbonylhydridferrat unter CO-Atmosphäre [37]. Auch nach diesem Verfahren ist die Methylierung vergleichsweise aufwendig.

Die von mir durchgeführte Derivatisierung ist in der Ausführung einfach und verläuft mit sehr guten Ausbeuten. In wässriger Lösung werden die Aminosäureester mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Anschließend extrahiert man die N,N-Dimethylderivate mit Methylenchlorid aus der Reaktionslösung. Die eingeengte organische Phase wird gaschromatographisch untersucht.

Die so hergestellten N,N-Dimethylaminosäureester sind leicht flüchtig und eignen sich sehr gut zur Gaschromatographie. Folgende Aminosäuren lassen sich mit dieser Methode derivatisieren und mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmen :

Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Methionin, Prolin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin.

Zur Strukturermittlung der entstandenen Reaktionsprodukte dienten die Spektren und die Elementaranalyse. Für N,N-Dimethylphenylalaninmethylester (11) werden die Spektren nachfolgend diskutiert.

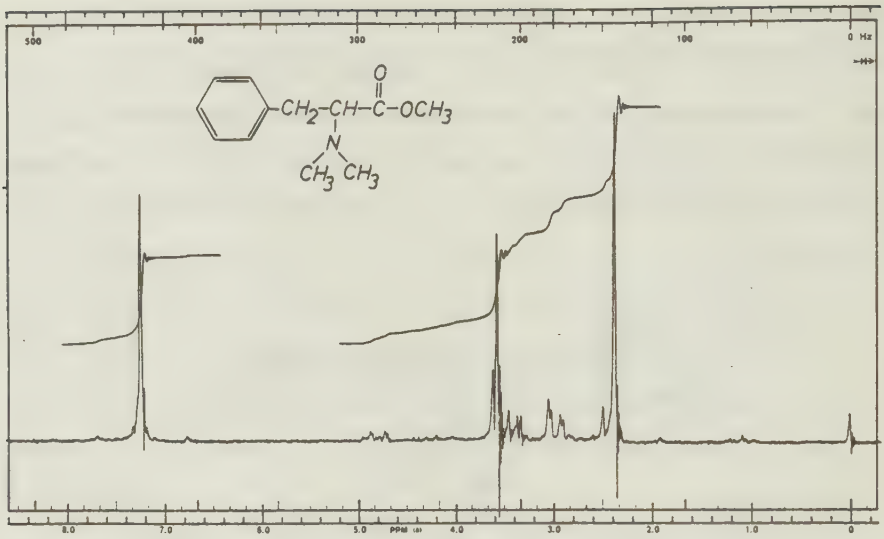


11

Die Substanz 11 ist ein farbloses Öl. Aufgrund der Elementaranalyse und des Molpeaks läßt sich die Elementarzusammensetzung $C_{12}H_{17}O_2N_1$ angeben.

Im NMR-Spektrum geben die bei der Derivatisierung eingeführten Methylgruppen je ein Singulett bei δ = 2,40 ppm (Dimethylaminogruppe) und bei δ = 3,60 ppm (Methylestergruppe). Der CH_2-Gruppe ist das Multiplett bei δ = 3,00 ppm zuzuordnen, dem Proton am α-C-atom das Triplett bei δ = 3,50 ppm. Die Protonen des Phenylrings findet man als Singulett bei δ = 7,30 ppm.

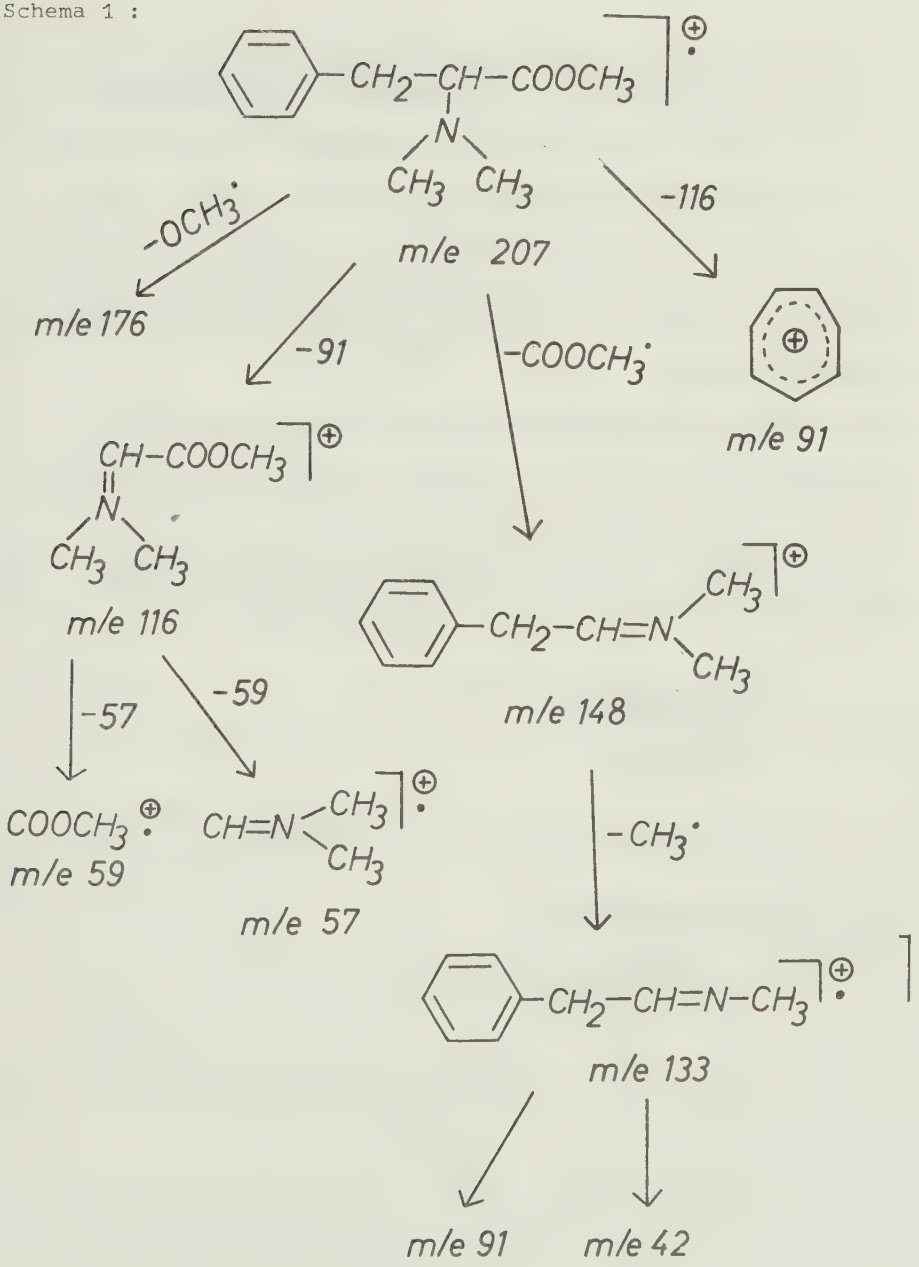
Charakteristisch für die Estergruppe ist im IR-Spektrum die Bande bei 1730 cm^{-1}.



NMR-Spektrum von 11

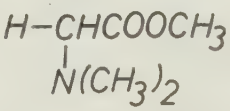
Beim massenspektrometrischen Abbau von 11 beobachtet man die für Ester typischen Fragmentierungen. Abspaltung der H_3CO-Gruppe bzw. der gesamten Estergruppe gibt die Bruchstücke m/e 176 und m/e 148. Mit der höchsten Intensität entsteht das Ion m/e 116, das sich aus dem Molekülpeak durch Verlust der Benzylgruppe bildet. Die Benzylbindung wird leicht gelöst, da eine Stabilisierung des Radikals durch den Phenylring möglich ist. Die Benzylgruppe kann aber auch als Kation abgetrennt werden, wobei das resonanzstabilisierte Tropyliumkation m/e 91 gebildet wird.

Schema 1 :

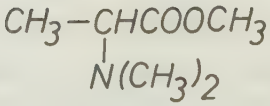

CH2–CH–COOCH3
N
CH3 CH3
m/e 207
-OCH3
m/e 176
-91
-116
m/e 91
-COOCH3
CH–COOCH3
N
CH3 CH3
m/e 116
-57
-59
COOCH3
m/e 59
CH=N
CH3
CH3
m/e 57
CH2–CH=N
CH3
CH3
m/e 148
-CH3
CH2–CH=N–CH3
m/e 133
m/e 91
m/e 42

Da alle Aminosäuren ein gleiches Strukturelement, eine Carboxylgruppe mit einer Aminofunktion in α-Stellung, enthalten, treten einige der beim Phenylalanin aufgeführten Bruchstücke auch bei den analogen Derivaten anderer Aminosäuren auf. Z.B. entsteht das Fragment m/e 116 beim massenspektrometrischen Abbau der meisten N,N-Dimethylaminosäuremethylester mit großer Intensität. Es kann als Hinweis auf methylierte α-Aminosäuren angesehen werden.

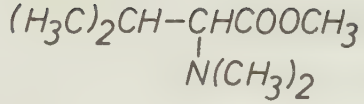
Nachstehend werden die Massenspektren der einzelnen Aminosäurederivate tabellarisch aufgezeigt. Die Massenspektren sind von Interesse, weil zur Identifizierung von Peaks im Gaschromatogramm häufig die Kombination Gaschromatographie / Massenspektrometrie herangezogen wird.

12 

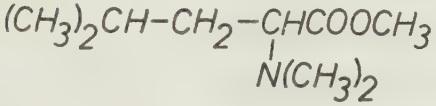
117(60), 58(100), 86(30), 73(30), 44(60)

13 

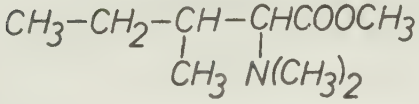
131(12), 116(15), 100(10), 72(100), 59(20), 57(20), 44(20)

14 

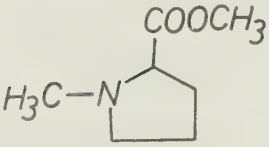
159(8), 128(15), 116(20), 100(100), 44(20), 42(20)

15 

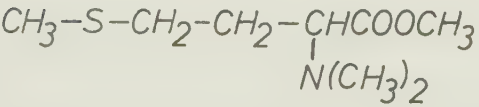
173(2), 142(45), 114(100), 116(45), 71(90), 59(50), 57(52), 43(31)

16 

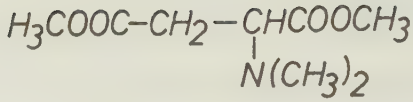
173(2), 142(45), 116(45), 114(100), 59(50), 57(22), 44(10), 43(10), 42(40)

17 

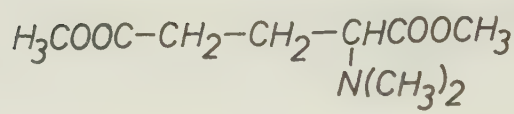
143(7), 112(15), 84(100), 69(17), 59(10), 42(10)

18 

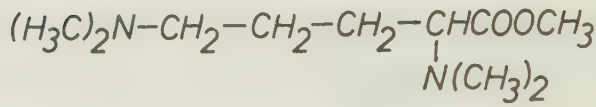
191(9), 132(100), 117(8), 116(53), 84(74), 71(50), 59(10), 57(20), 42(20)

19 

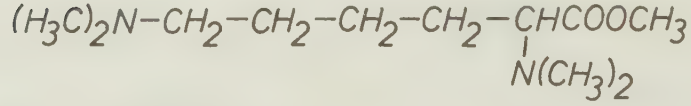
189(9), 130(100), 116(66), 71(67), 59(40), 57(60)

20 

203(6), 172(36), 144(100), 116(52), 85(81), 71(41), 59(17), 57(33)

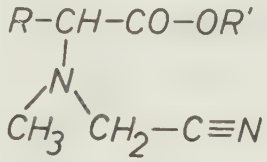
21 

202(10), 158(84), 144(30), 143(100), 130(18), 127(63), 116(80), 99(100), 85(68), 71(54), 57(40)

22 

216(5), 172(84), 157(100), 116(75), 113(100), 99(22), 85(100), 71(68), 57(55), 59(80), 42(20)

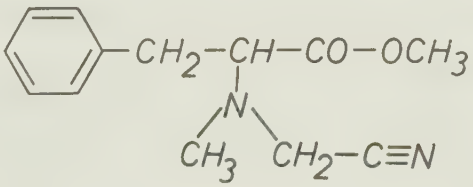
Führt man die Methylierung der Aminosäureester mit einem zu geringen Überschuß an Natriumcyanoborhydrid aus, so können sich Nebenprodukte bilden, die N-Cyanomethyl-N-methylderivate 23 :



23

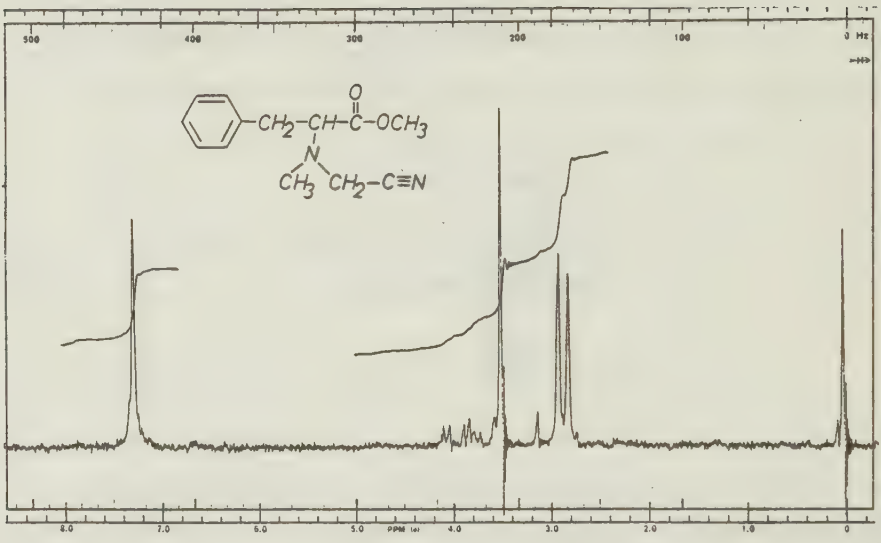
Sie sind ebenfalls flüchtig. So können für eine Aminosäure zwei Peaks im Gaschromatogramm auftreten. Setzt man Natriumcyanoborhydrid in viermolarem Überschuß ein, so sind diese Nebenprodukte nicht mehr nachweisbar.

Zum Vergleich mit dem N,N-Dimethylderivat 11 werden die Spektren von N-Cyanomethyl-N-methyl-phenylalaninmethylester 24 kurz erläutert.



24

Im IR-Spektrum tritt eine zusätzliche Absorptionsbande bei 2280 cm^{-1} auf. Sie ist kennzeichnend für die Cyanogruppe.

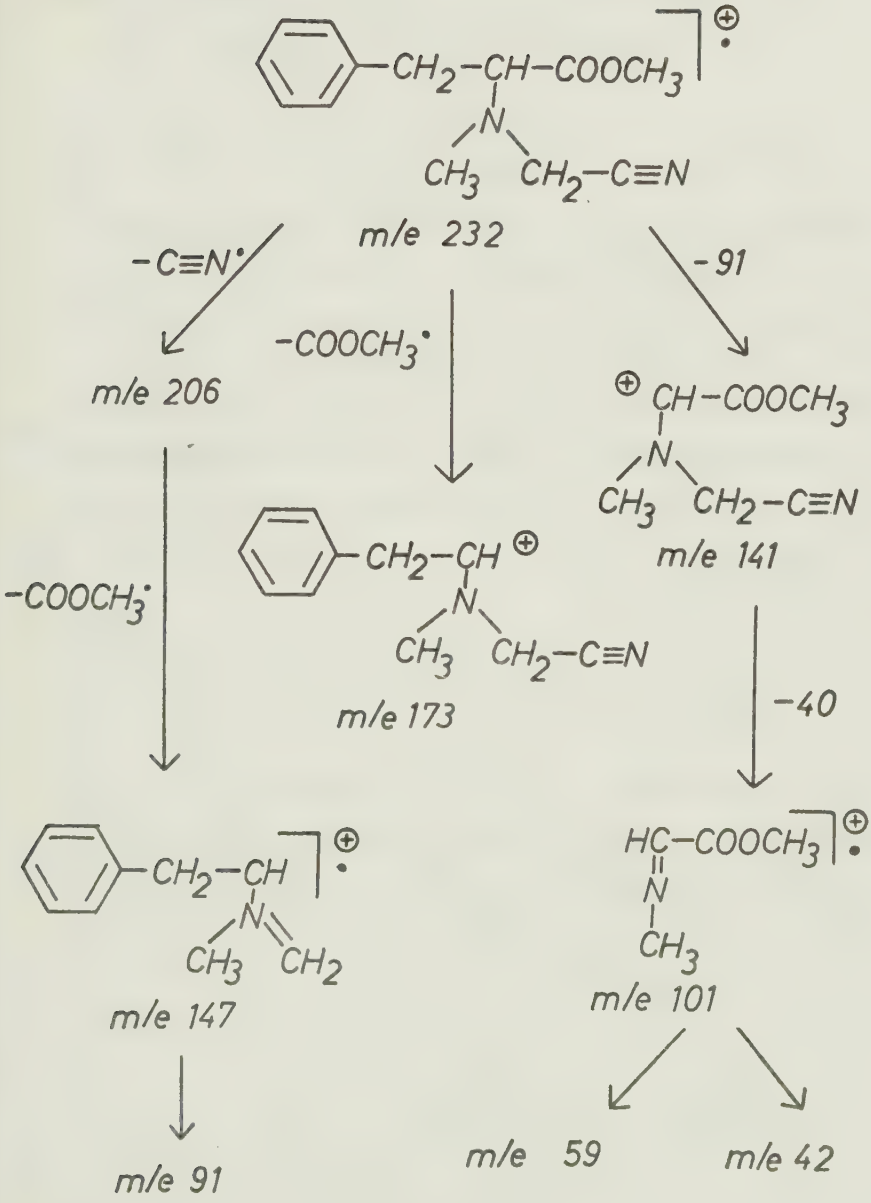


NMR-Spektrum von 24

Die Protonen der N-Methylgruppe erscheinen im NMR-Spektrum als Singulett bei δ = 2,90 ppm, die der Cyanomethylgruppe ebenfalls als Singulett bei δ = 2,80 ppm. Die übrigen auftretenden Signale wurden bereits bei der N,N-Dimethylverbindung 11 diskutiert.

Die Fragmentierung von 24 im Massenspektrometer verläuft der von 11 analog, wie dem folgenden Schema zu entnehmen ist.

Schema 2 :


m/e 232
-C≡N·
m/e 206
-COOCH3·
-COOCH3·
m/e 173
-91
m/e 141
-40
m/e 147
m/e 91
m/e 101
m/e 59
m/e 42

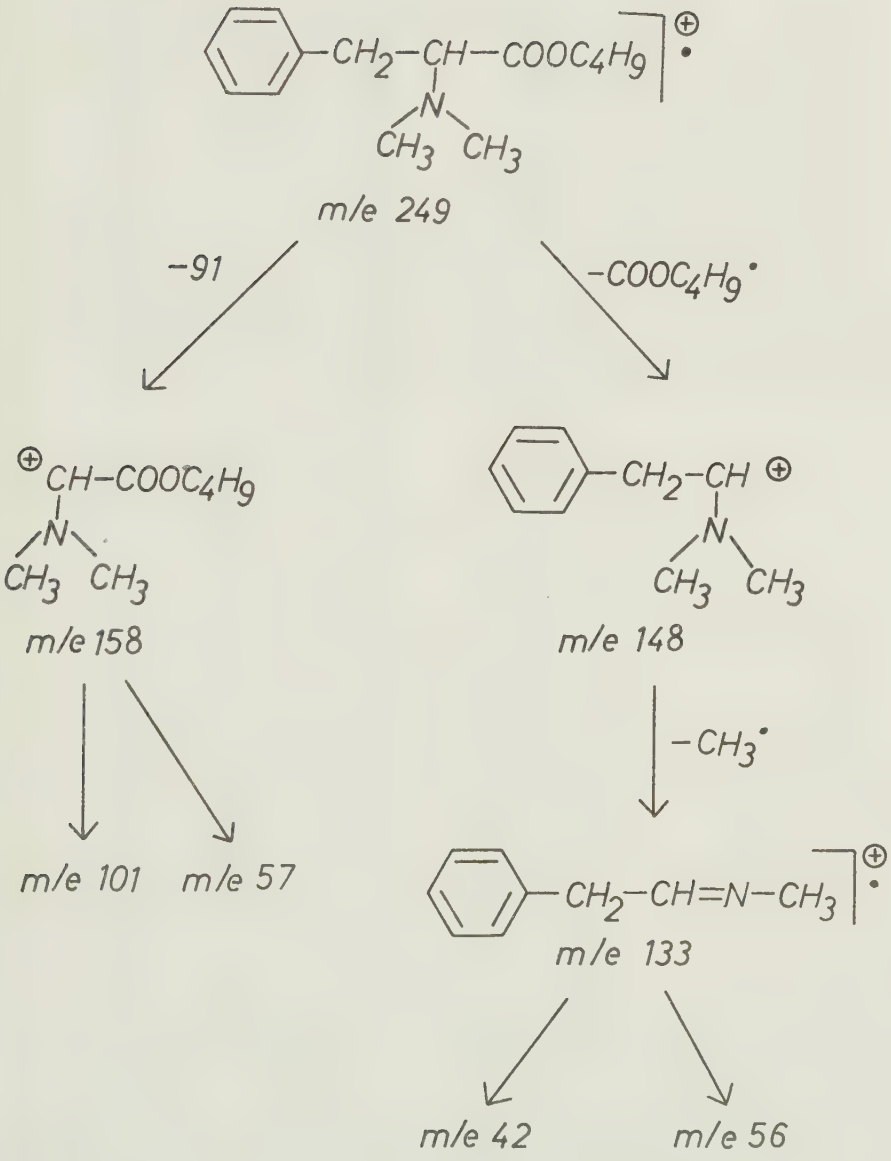
Die Struktur der Verbindung 24 wird durch die Elementaranalyse bestätigt. Aus ihr ergibt sich die Zusammensetzung $C_{13}H_{16}N_2O_2$.

Zur Veresterung der Carboxylgruppe in Aminosäuren können verschiedene Alkohole verwendet werden. Ich setzte Methanol und n-Butanol ein. Die höhere Flüchtigkeit der Methylester kann von Vorteil sein, wenn höhermolekulare Aminosäuren bzw. Reaktionsprodukte oder Peptide zu untersuchen sind. Bei der Identifizierung unbekannter Verbindungen erleichtert die Methylgruppe im Vergleich zur Butylgruppe die Interpretation der Spektren. Die hohe Flüchtigkeit der Aminosäuremethylester kann bei der Bestimmung niedermolekularer Aminosäuren zu Verdampfungsverlusten führen. Hier empfiehlt sich der Einsatz von Butylestern.

Im NMR-Spektrum der N,N-Dimethylaminosäurebutylester erscheint die Butylgruppe als Multiplett im Bereich von δ = 1,00 - 3,50 ppm.

Der massenspektrometrische Abbau der N-methylierten Aminosäurebutylester läuft dem der N,N-Dimethylaminosäuremethylester parallel. Am Beispiel des N,N-Dimethylphenylalaninbutylesters wird der Zerfall dieser Derivate im Massenspektrometer schematisch aufgezeigt.

Schema 3 :



Viele der natürlich vorkommenden Aminosäuren lassen sich nach Veresterung und N-Methylierung gaschromatographisch trennen. Dabei treten jedoch bei Verwendung einfacher Säulen einige Überlappungen auf. Auf einer 5% OV 17 -Säule z.B. werden Leucin und Isoleucin, Glutaminsäure und Methionin sowie Lysin und Phenylalanin nicht getrennt (Abb. 1). Bei Verwendung einer 2,5% SP 1000 -Säule erscheinen Glycin und Alanin als ein Peak, hingegen lassen sich Glutaminsäure und Methionin sowie Lysin und Phenylalanin trennen (Abb. 2).

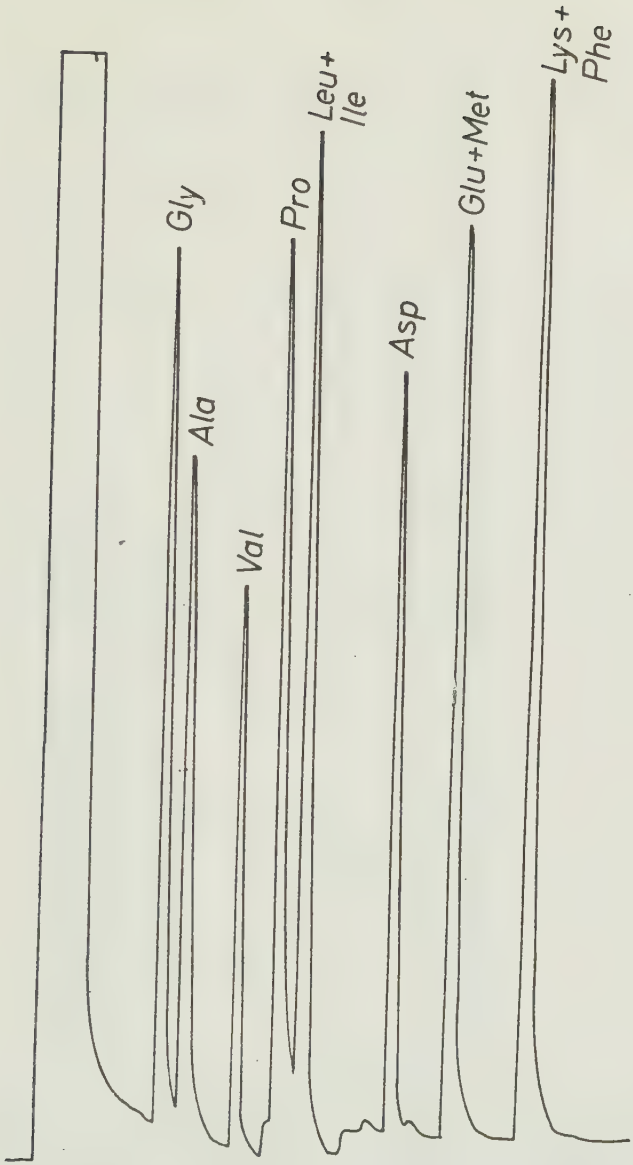


Abb. 1: GC-Trennung von N,N-Dimethylaminosäurebutylestern; Säule: 5% OV 17 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

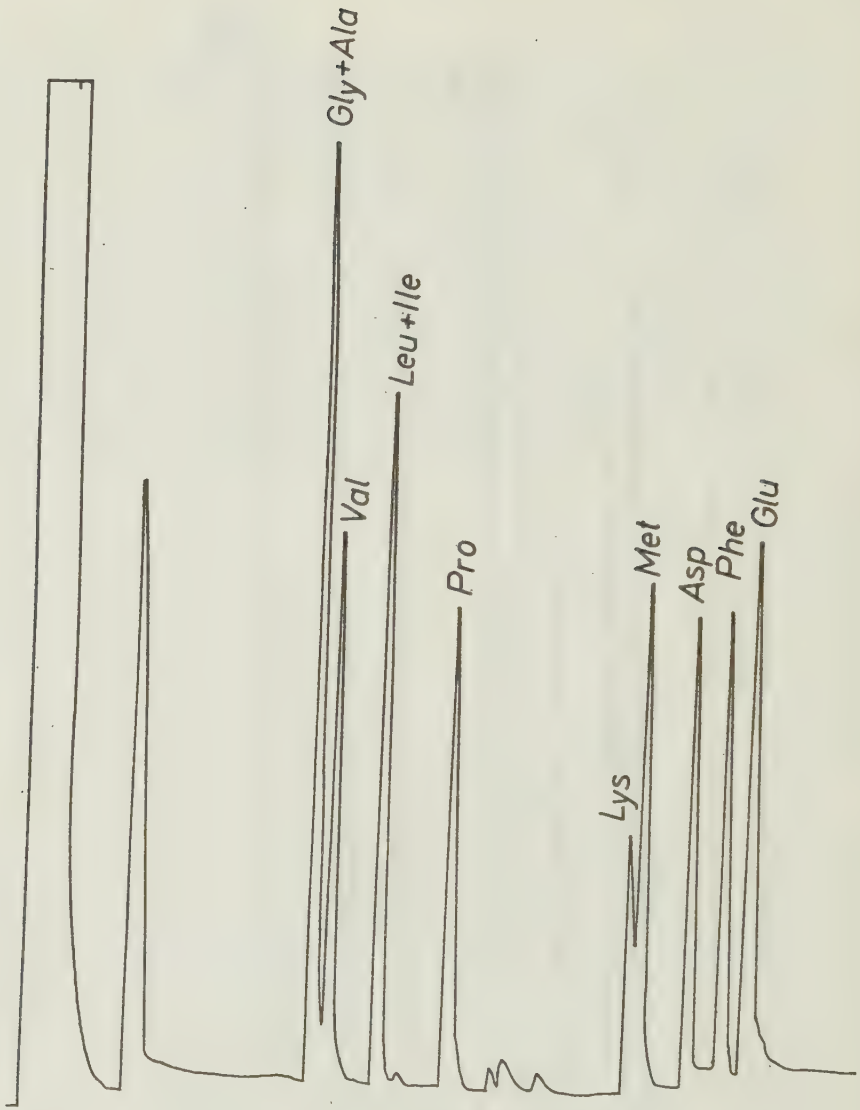
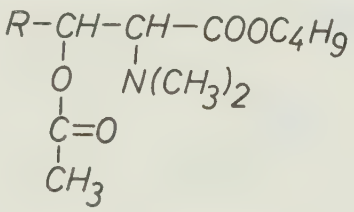


Abb. 2 : GC-Trennung von N,N-Dimethylaminosäurebutylestern; Säule: 2,5% SP 1000 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 1,8 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

III. Gaschromatographische Analyse von Aminosäuren als N,N-Dimethylaminosäurebutylester und O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylester

Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen im Molekül wie Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Tyrosin, Cystein, Histidin und Arginin lassen sich nach der beschriebenen Methode ebenfalls alkylieren. Die HO- und HS-Gruppen werden dabei nicht verändert. Im Histidin wird der heterocyclische Ring nicht angegriffen und beim Arginin bleibt die N-Methylierung unvollständig. Die N,N-Dimethylaminosäurebutylester dieser Aminosäuren sind infolge der Anwesenheit der polaren Gruppen schwerer flüchtig und ihre gaschromatographischen Eigenschaften unbefriedigend. Daher acetylierte ich zusätzlich mit Acetanhydrid und erhielt die O(S)-Acetyl-N,N-dimethylderivate 25.

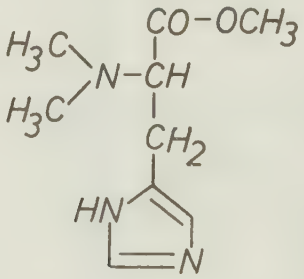


25

Auf diesem Weg konnten Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Tyrosin und Cystein derivatisiert und die Derivate gaschromatographisch erfaßt werden. Bei Arginin und Histidin führte auch die Acetylierung nicht zu gaschromatographierbaren Produkten. Es liegt der Verdacht nahe, daß diese beiden Aminosäuren bei der

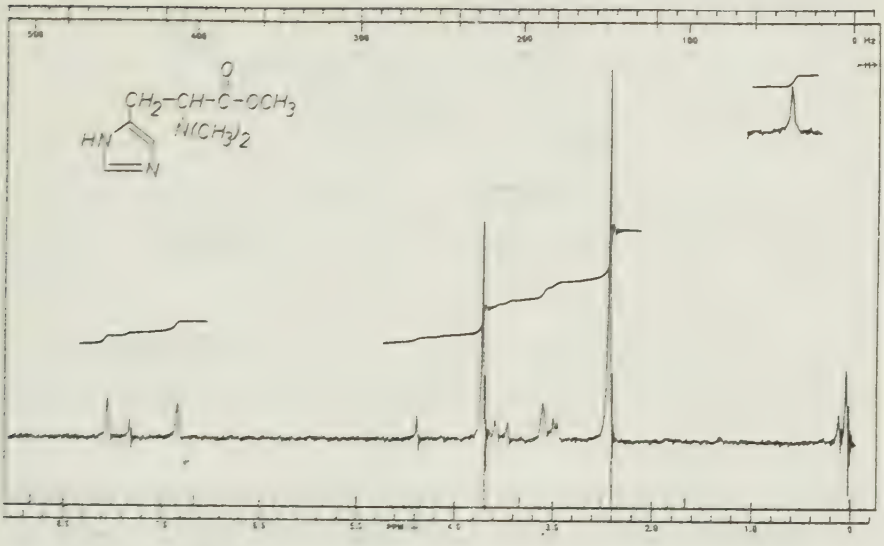
Veresterung oder bei der N-Methylierung nicht oder nur unvollständig umgesetzt wurden. Im Fall des Histidins konnte ich jedoch diesen Verdacht durch ausgedehnte Untersuchungen ausräumen.

Histidin löst sich in den zur Veresterung benutzten Alkoholen schlecht. Rührt man aber während der Veresterung und erhitzt bis zur vollständigen Lösung der Aminosäure unter Rückfluß, so entsteht der Ester quantitativ. Bei der Reaktion von Histidinmethylester mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid fällt ein Hauptprodukt in 90 %iger Ausbeute an. Es ist eine farblose, ölige Substanz, die im Hochvakuum bei 160°C destillierbar ist. Die Struktur ergibt sich aus den Spektren. Es handelt sich um N,N-Dimethylhistidinmethylester (26).



26

Eine NH-Bande im IR-Spektrum bei 3200 cm^{-1} zeigt, daß nicht alle Stickstoffatome des Histidins methyliert vorliegen. Die Bande der Estergruppe ist im Carbonylbereich bei 1740 cm^{-1} erkennbar.



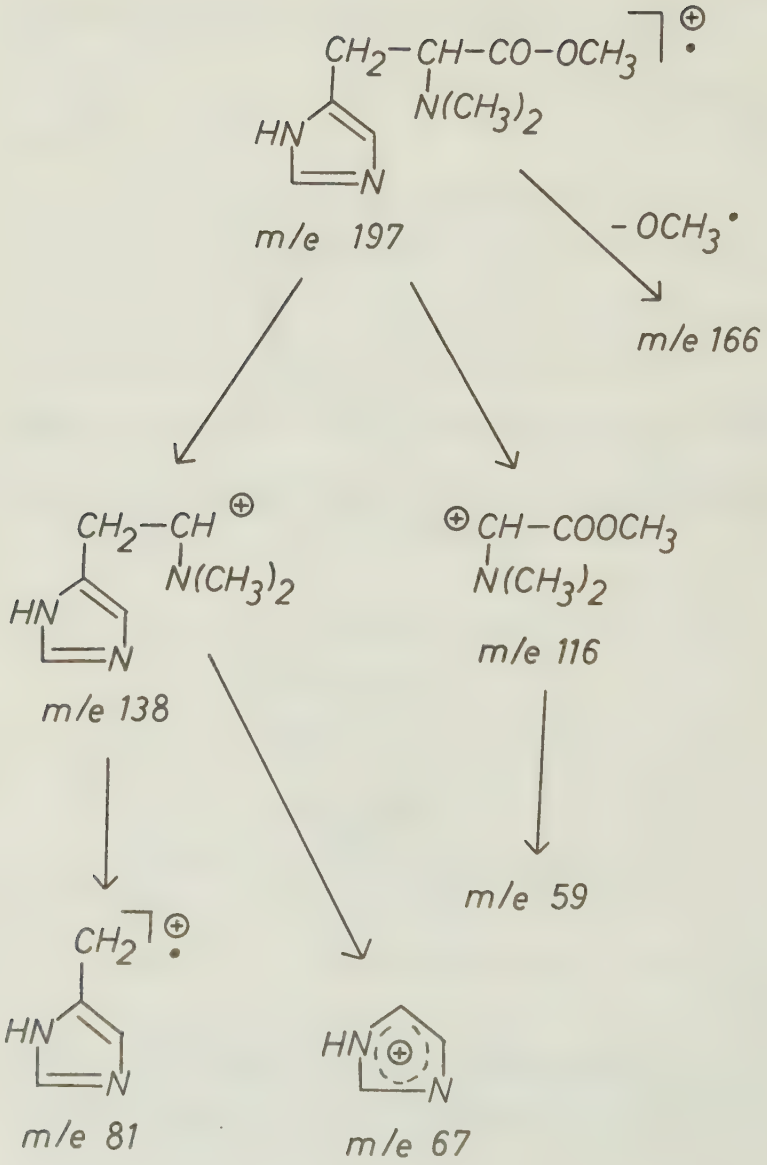
NMR-Spektrum von 25

Das NMR-Spektrum zeigt für die N,N-Dimethylgruppe ein Singulett bei δ = 2,40 ppm, für die O-Methylgruppe ebenfalls ein Singulett bei δ = 3,70 ppm. Die Signale der C-gebundenen Protonen im Imidazolring liegen bei δ = 6,80 und 7,30 ppm. Dem NH-Proton des Imidazols ist ein Singulett im tieferen Feld bei δ = 9,00 ppm zuzuordnen. Die übrigen Protonen des Moleküls geben ein Multiplett im Bereich von δ = 3,00 - 3,60 ppm.

Der Zerfall von 25 im Massenspektrometer ist in Schema 4 dargestellt.

Bevorzugt wird die Estergruppe abgetrennt, wobei sich m/e 138 bildet. Bei Abspaltung der Aminoäthergruppe entsteht m/e 116 bzw. m/e 81. Das Bruchstück m/e 81 ist das Imidazoliumkation.

Schema 4 :


CH2–CH–CO–OCH3
N(CH3)2
HN
N
m/e 197
- OCH3•
m/e 166
CH2–CH
N(CH3)2
HN
N
m/e 138
CH–COOCH3
N(CH3)2
m/e 116
m/e 59
CH2
HN
N
m/e 81
HN
N
m/e 67

Der N,N-Dimethylhistidinmethylester ist wegen seiner geringen Flüchtigkeit für die Gaschromatographie ungeeignet. Auch die Acetylierung bringt keine Vorteile, da das entstehende Produkt sehr instabil ist.

Beim Arginin wurde das methylierte Produkt nicht rein isoliert. Die zusätzliche Acetylierung führte jedoch zu keinem flüchtigen Derivat.

Tryptophan blieb bei den Untersuchungen unberücksichtigt, da sich diese Aminosäure bei der sauren Hydrolyse von Proteinen zersetzt.

Ich setzte die beschriebene Methode zur Analyse von Aminosäuregemischen ein. Diese wurden zunächst verestert, dann N-methyliert und acetyliert. Bei Anwesenheit von Aminosäuren mit HO- und HS-Gruppen ist es sinnvoll, mit n-Butanol zu verestern. Die N,N-Dimethylderivate dieser Aminosäuren enthalten eine hydrophile Gruppe. Der Butylrest in der Estergruppe verstärkt den lipophilen Charakter der Substanzen mehr als ein Methylrest. Daher lassen sich die N,N-Dimethylaminosäurebutylester leichter mit organischen Lösungsmitteln aus der wässrigen Reaktionslösung extrahieren.

Die derivatisierten Aminosäuregemische wurden gaschromatographisch untersucht. Eine vollständige Auftrennung der Derivate gelang bei Anwendung der gängigen handelsüblichen Gaschromatographie-Säulen nicht.

Auf einer 5% SE 30 -Säule von 4 m Länge werden die Aminosäuren Phenylalanin und Asparaginsäure sowie Leucin, Isoleucin und

Hydroxyprolin nicht getrennt (Abb. 3). Asparaginsäure und Phenylalanin lassen sich auf einer 2,5% SP 1000 -Säule (1,8 m) trennen. Dagegen erscheinen Methionin und Cystein, Threonin und Hydroxyprolin sowie Glycin, Alanin und Serin jeweils als ein Peak (Abb. 4). Bei Anwendung einer 5% Apiezon M -Säule (2 m) überlagern sich die Paare Glutaminsäure und Lysin, Valin und Prolin, Alanin und Serin sowie Leucin, Isoleucin und Hydroxyprolin (Abb. 5).

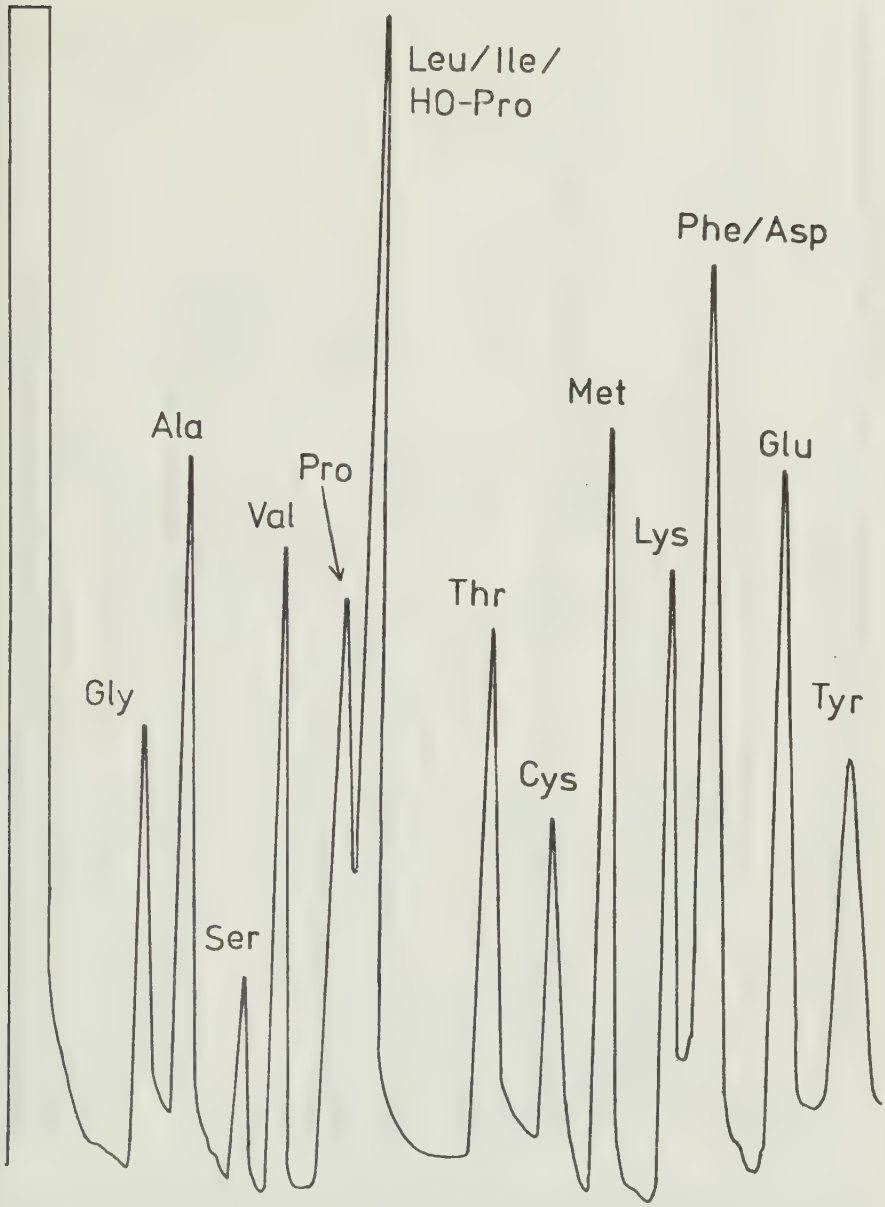


Abb. 3: GC-Trennung von O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylestern; Säule: 5% SE 30 auf 60-80 mesh Chromosorb W AW DMCS; 4 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

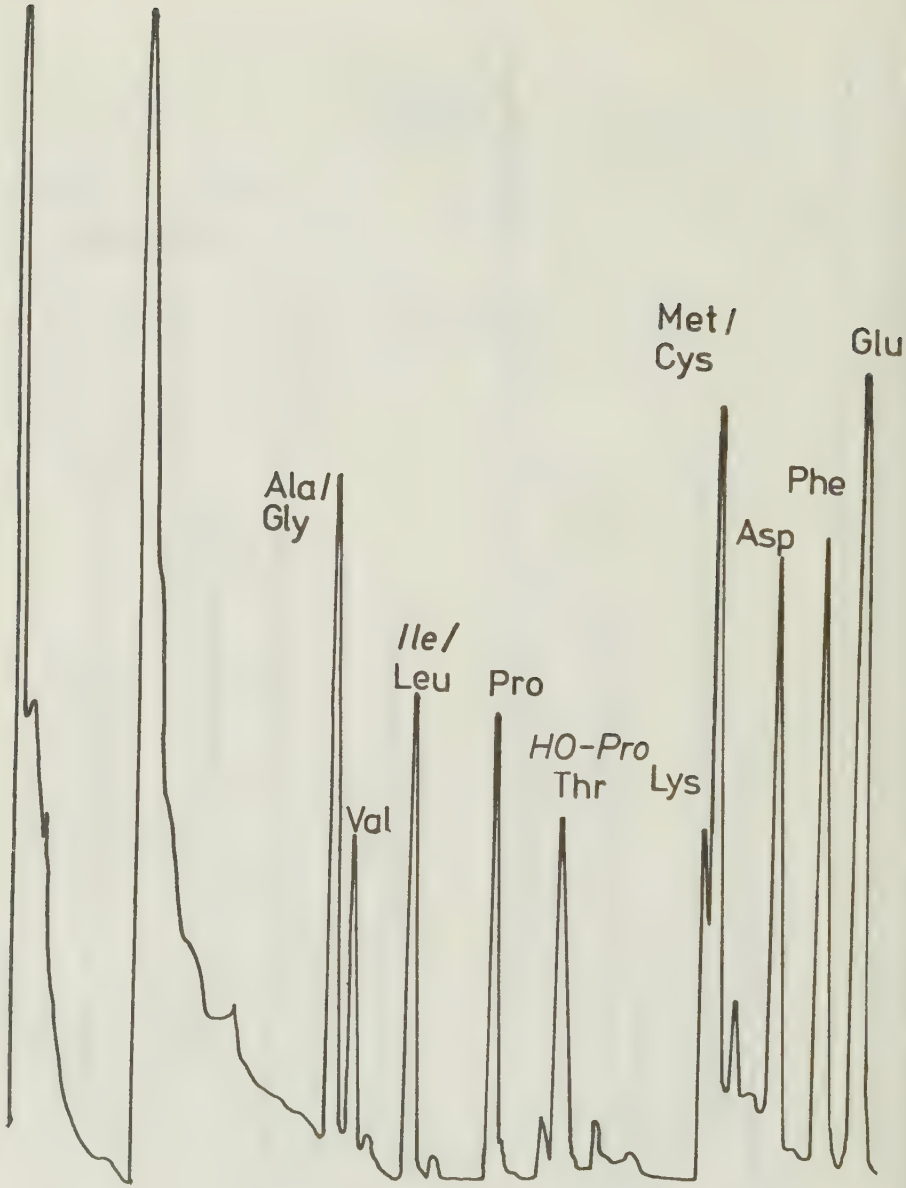


Abb. 4: GC-Trennung von O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylestern; Säule: 2,5% SP 1000 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 1,8 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperraturrate 4°/min

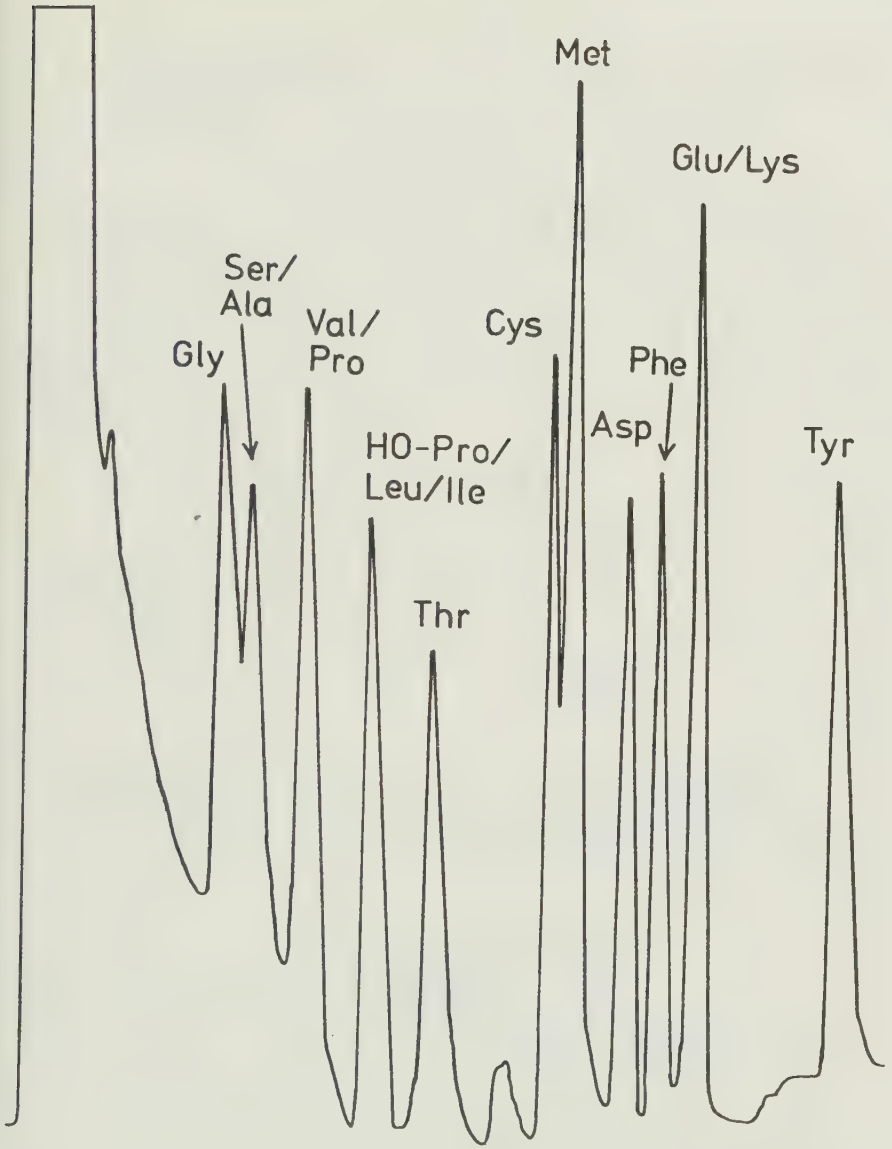
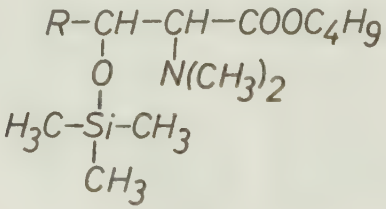


Abb. 5: GC-Trennung von O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylestern; Säule: 5% Apiezon M auf 80-100 mesh Chromosorb W AW, 2,5 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

IV. Gaschromatographische Analyse von Aminosäuren als N,N-Dimethylaminosäurebutylester und N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylester

Als Schutzgruppe für die bei der Methylierung nicht umgesetzten HO- und HS-Gruppen bietet sich unter anderen auch die Trimethylsilylgruppe an. Erhitzt man die N,N-Dimethylaminosäurebutylester mit N,N-Bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid oder einem anderen Silylierungsmittel im geschlossenen System 15 Minuten auf 150°C, so gelingt die Derivatisierung der HO- und HS-Gruppen von Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Tyrosin und Cystein. Histidin und Arginin werden unter diesen Bedingungen nicht vollständig derivatisiert. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 2,5 Stunden, wie sie von Gehrke und Leimer [38] vorgeschlagen wird, führt zu keinen besseren Ergebnissen.

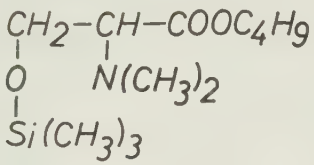
Die N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylester 27 wurden gaschromatographisch getrennt und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.



27

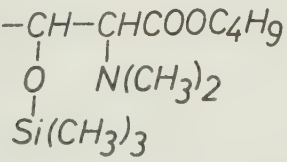
Im Massenspektrum der Derivate tritt als Ion mit der höchsten Intensität M^+-101 auf. Es entsteht durch Fragmentierung an der Estergruppe. Abtrennung der alkylierten Aminosäurefunktion führt zu m/e 158. Typisch für alle Trimethylsilylverbindungen ist die leichte Abspaltbarkeit einer Methylgruppe (M^+-15) und der Verlust von $-Si(CH_3)_3$ (M^+-73).

Für N,N-Dimethyl-O-trimethylsilyl-serinbutylester 28 sind die Zerfallswege in Schema 5 aufgezeigt.



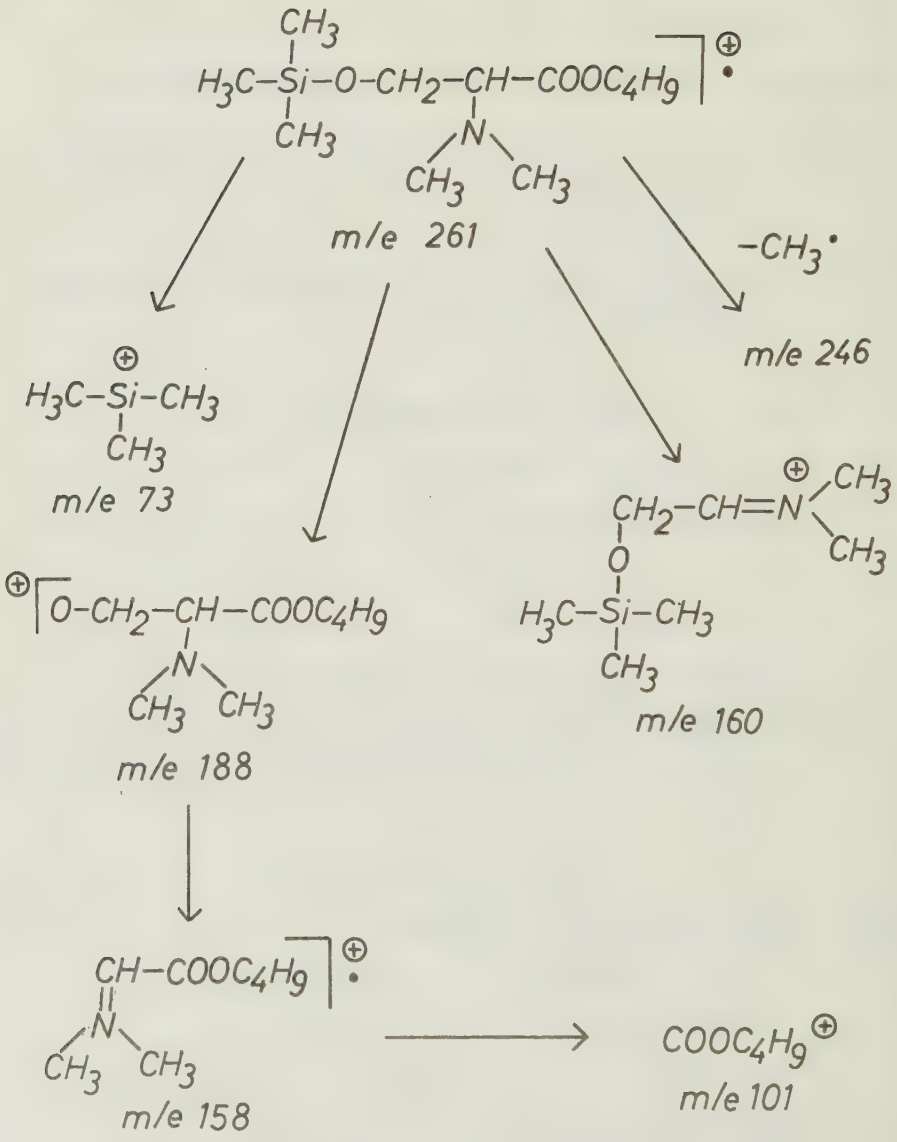
28

Die Fragmentierung der Derivate von Threonin, Hydroxyprolin, Tyrosin und Cystein verläuft der bei Serin beschriebenen parallel. Die m/e-Werte dieser Verbindungen sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

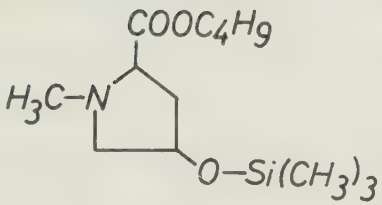
29 

275(2), 260(15), 231(27), 202(20), 174(100), 158(67), 117(47), 101(54), 85(26), 73(40), 57(20)

Schema 5 :

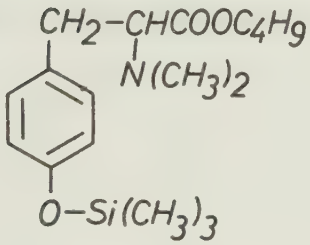


30



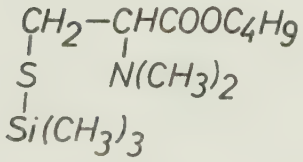
273(5), 258(15), 200(7), 172(100), 99(26), 83(40), 73(33), 57(20)

31



337(4), 322(6), 293(36), 236(100), 179(52), 158(88), 101(70), 73(53), 57(23)

32



277(5), 262(17), 204(30), 176(100), 158(75), 101(68), 73(40), 57(20)

Auch N,N-Dimethyl-N-trimethylsilyl-histidinbutylester gibt im Gaschromatogramm einen Peak. Die Verbindung ist allerdings so instabil, daß nur ein Bruchteil der Aminosäurekonzentration

gaschromatographisch erfaßt wird. Bei einer quantitativen Bestimmung konnte ich nur 30% des eingesetzten Histidins wiederfinden.

Zur gaschromatographischen Trennung derivatisierter Aminosäuregemische benutzte ich ausschließlich mit Siliconen belegte Säulen, da auf polaren Phasen Zersetzungen von Silylderivaten festgestellt wurden [32].

Abb. 6 zeigt das Gaschromatogramm eines Aminosäuregemisches, das zunächst verestert, dann N-methyliert und silyliert wurde.

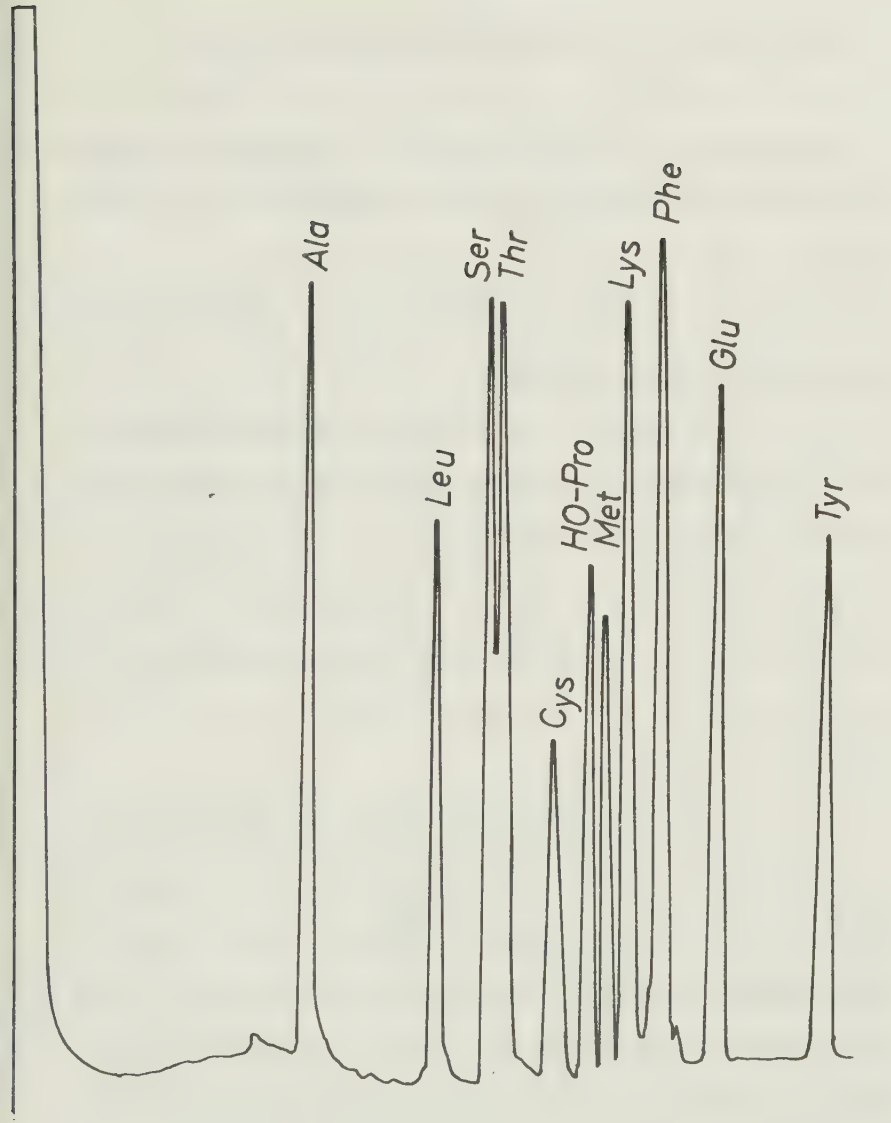


Abb. 6: GC-Trennung von N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylestern; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

V. Darstellung der N,N-Dimethylderivate von biogenen Aminen

Die Methylierung verschiedener Amine mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid ist in der Literatur beschrieben. Die erzielten Ausbeuten liegen bei über 90%. Es liegt nun nahe, diese Methode auf eine bedeutende Gruppe von Aminen, die biogenen Amine anzuwenden. Diese Substanzgruppe spielt in der Lebensmittelchemie eine große Rolle.

Bei unsachgemäßer Lagerung von Lebensmitteln können aus Diaminocarbonsäuren durch mikrobielle Decarboxylierung die entsprechenden biogenen Amine entstehen, z.B. Putrescin aus Ornithin, Kadaverin aus Lysin. Diese Amine werden auch beim Eiweißabbau im Verlauf von Käsereifungen gebildet. Tyramin und Histamin wurden im Wein gefunden. Der Histamin-Gehalt verschiedener Weine wird für ihre schlechte Verträglichkeit verantwortlich gemacht.

Viele biogene Amine haben starke pharmakologische Wirkungen, andere spielen als Vorstufen von Hormonen und als Bausteine anderer biologisch wichtiger Substanzen eine Rolle. Kadaverin und Putrescin z.B. wirken blutdrucksenkend, Tyramin dagegen steigert den Blutdruck [39].

Zur Bestimmung der biogenen Amine dienen in erster Linie gaschromatographische Methoden. Die Derivatisierung erfolgt mit den aus der Aminosäureanalytik bekannten Reagenzien, z.B. durch Umsetzung mit Silylierungsmitteln [40].

Ich untersuchte die Methylierung mit Formaldehyd / Natrium-

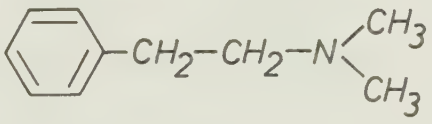
cyanoborhydrid an folgenden biogenen Aminen :

2-Phenyläthylamin, Tyramin, Kadaverin und Cysteamin.

Die Reaktion verläuft mit guten Ausbeuten (über 90%) und die gebildeten N,N-Dimethylderivate sind gut gaschromatographierbar.

Zur Strukturbestätigung wurden für das 2-Phenyläthylaminderivat die Spektren angefertigt, die Derivate der übrigen biogenen Amine wurden durch Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie identifiziert.

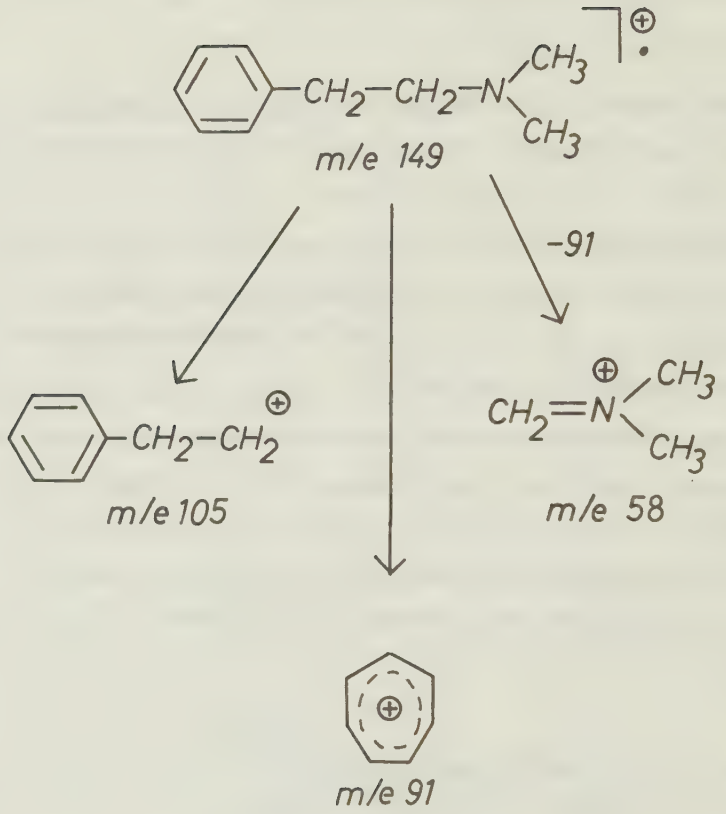
Im NMR-Spektrum von N,N-Dimethyl-2-phenyläthylamin (33) sind die beiden Singuletts der $N(CH_3)_2$-Gruppe (δ = 2,30 ppm) und den aromatischen Protonen (δ = 7,30 ppm) zuzuordnen. Die Integration bestätigt diese Interpretation. Die CH_2-Gruppen des Moleküls geben ein Multiplett bei δ = 2,70 ppm.



33

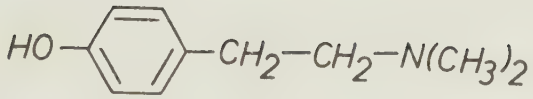
Der Abbau von 33 im Massenspektrometer geht folgendermaßen vonstatten :

Schema 6 :

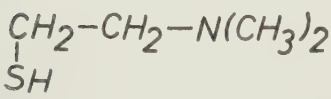


Bevorzugt wird bei Elektronenbeschuß die Bindung zwischen den beiden CH_2-Gruppen gespalten; es resultiert das resonanzstabilisierte Tropyliumkation m/e 91 bzw. das N-haltige Fragment m/e 58. Mit hoher Intensität entsteht noch das Ion m/e 105, das aus M^+ durch Verlust von $-N(CH_3)_2$ hervorgeht.

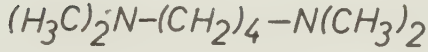
Bei den anderen untersuchten Aminderivaten beobachtet man analoge Fragmentierungen.

34 

165(50), 121(76), 107(64), 79(7), 77(66), 58(100)

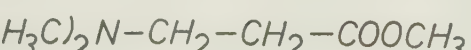
35 

105(100), 104(38), 58(100)

36 

158(35), 114(88), 100(75), 86(86), 72(38), 58(100)

Die biogenen Amine der Dicarbonmonoaminosäuren stellen wieder Aminosäuren dar, allerdings keine α-Aminosäuren. So ist das biogene Amin der Glutaminsäure die γ-Aminobuttersäure, das der Asparaginsäure β-Alanin. Wie die α-Aminosäuren lassen sich diese Substanzen nach Veresterung und anschließender Methylierung gaschromatographisch bestimmen und mit Hilfe der Kobination Gaschromatographie/Massenspektrometrie identifizieren.

37 

131(17), 116(32), 87(100), 73(20), 59(29), 58(20), 44(85)

38

145(54), 114(56), 101(12), 86(22), 72(27), 58(100)

Zur gaschromatographischen Trennung der unpolaren Aminderivate können Siliconsäulen und auch mit Polyestern oder Polyglykolen belegte Säulen herangezogen werden. Letztere sind besonders geeignet zur Analyse der polaren Aminderivate, etwa der Substanzen, die noch eine nicht umgesetzte funktionelle Gruppe enthalten, wie N,N-Dimethylcysteamin oder N,N-Dimethyltyramin.

Die folgende Abbildung 7 zeigt das Gaschromatogramm von drei derivatisierten biogenen Aminen.

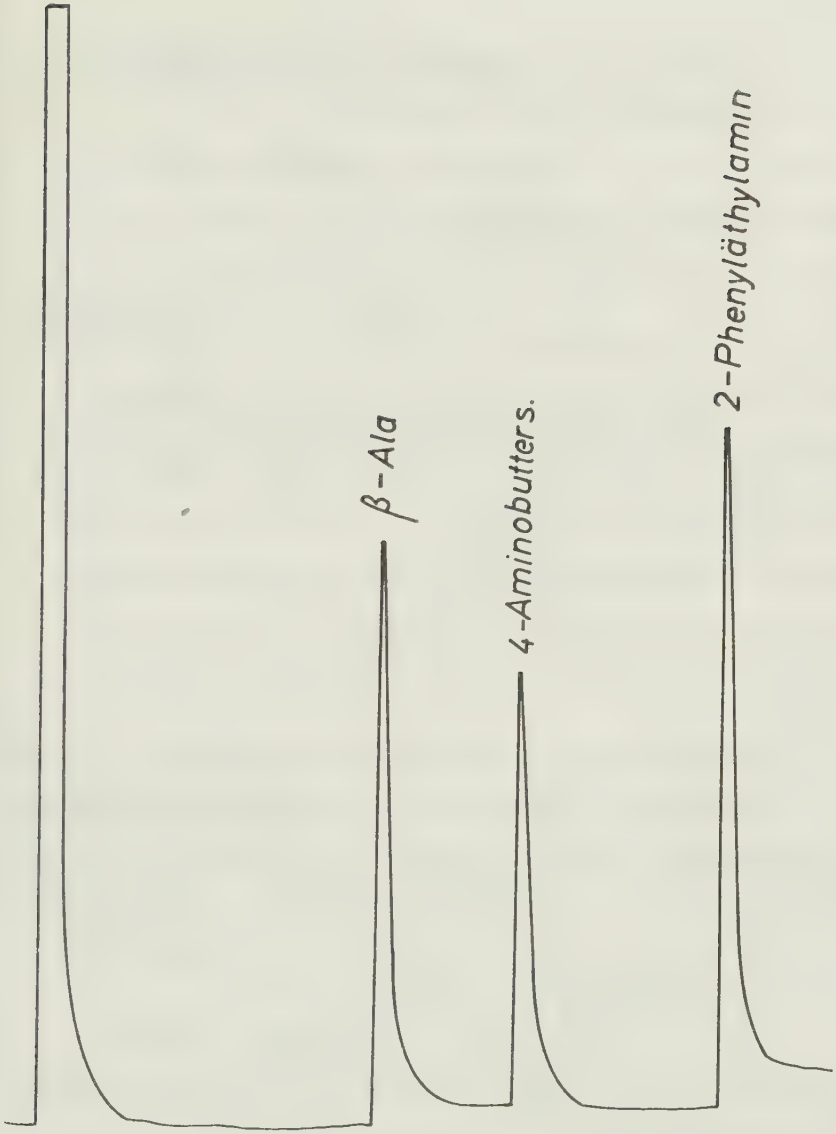


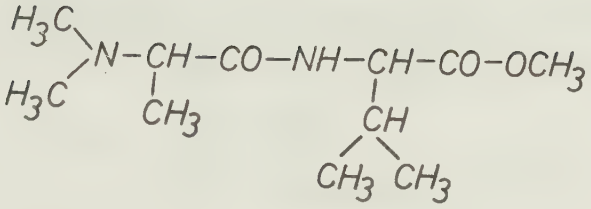
Abb. 7: GC-Trennung von N,N-Dimethylaminen; Säule 5% SE 30 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2,5 m x 1/8"; Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

VI. Derivatisierung von Dipeptiden mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid

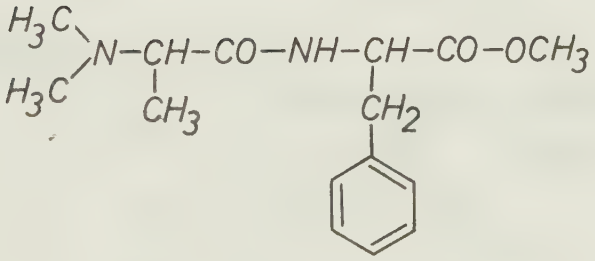
In jüngerer Zeit fand die Kombination Gaschromatographie / Massenspektrometrie zur Sequenzbestimmung von Peptiden Anwendung. Die Sequenz von Proteinen wurde bis dahin ausschließlich durch schrittweisen Abbau der Peptidkette ermittelt. Ein solcher Abbau ist aufwendig und zeitraubend. Er läßt sich wesentlich verkürzen, wenn man Sequenzen aus der chemischen oder enzymatischen Spaltung längerkettiger Peptide unmittelbar massenspektrometrisch identifiziert [41]. Das erfordert geeignete Peptidderivate, die genügend flüchtig sind und deren Massenspektren leicht interpretiert werden können. Die aus der Aminosäureanalytik bekannten Methoden, z.B. Veresterung und Acylierung wurden zur Peptidderivatisierung herangezogen [42].

Eine höhere Flüchtigkeit als die Acylverbindungen zeigen methylierte Peptide. Zudem sind ihre Massenspektren einfach interpretierbar. Die Methylierung läßt sich wie bei der Aminosäurederivatisierung durch Veresterung mit methanolischer HCl und anschließender Umsetzung mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid durchführen.

Ich stellte auf diesem Weg die Methylverbindungen von Dipeptiden her und untersuchte die Derivate gaschromatographisch und massenspektrometrisch. Die Massenspektren der Derivate von Alanylvalin (39) und Alanylphenylalanin (40) werden ausführlich erörtert.

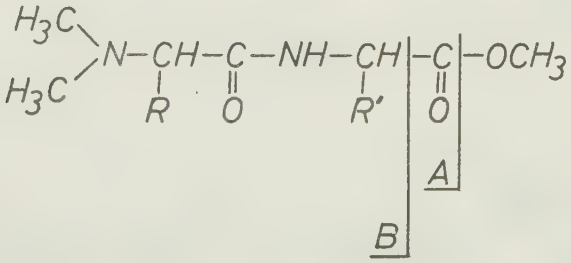


39

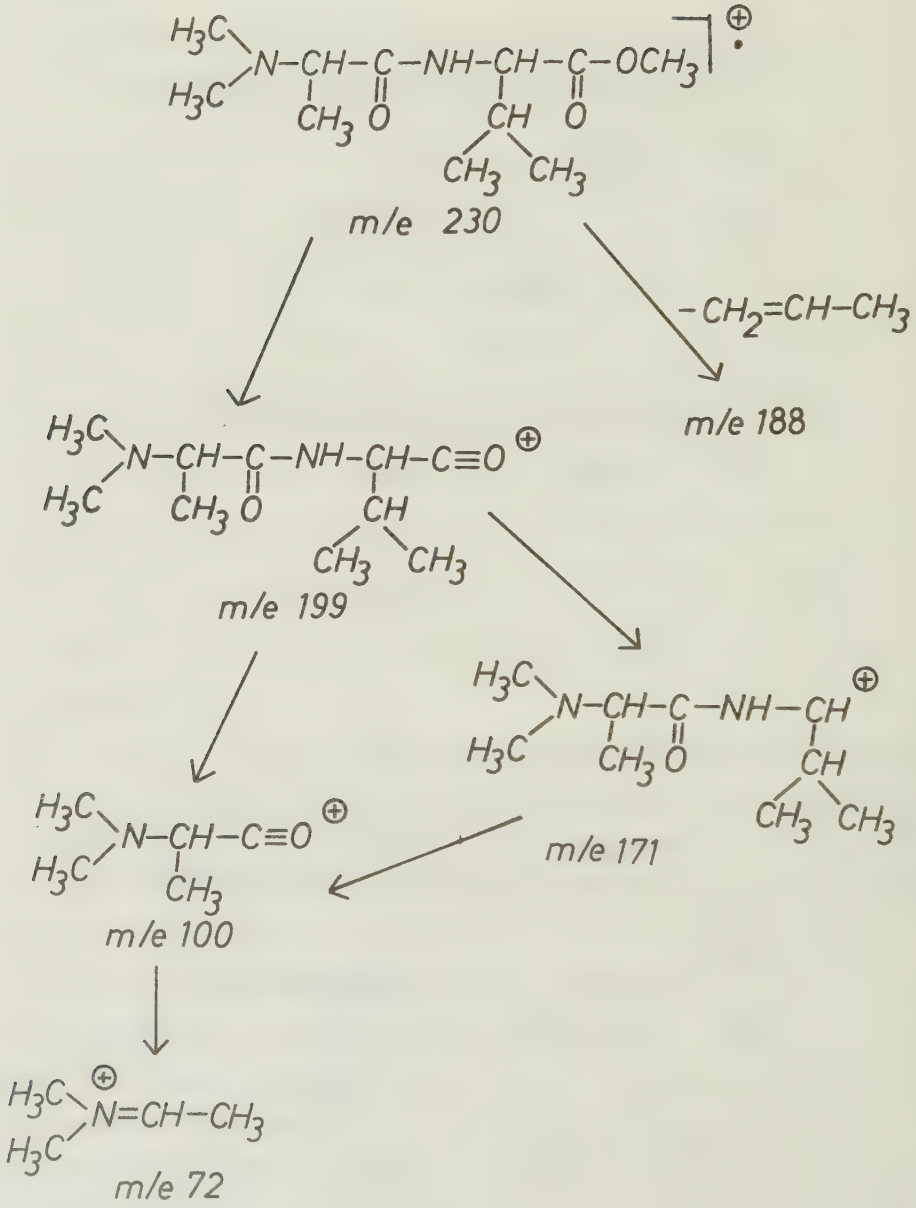


40

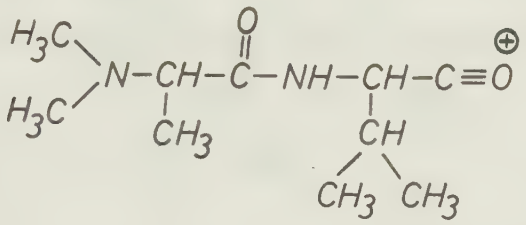
Spaltungen beiderseits der Carbonylgruppe in den Peptidbindungen zählen zu den wichtigsten Fragmentierungen von methylierten Peptiden. Es entstehen dabei zwei Arten von Ionen, die Acylium-Ionen (A) und die Acylaminocarbonium-Ionen (B):



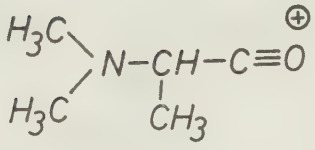
Schema 7 :



Beim Alanylvalinderivat entstehen durch einfache Kettenspaltung an der Peptidbindung folgende Acylium-Ionen :

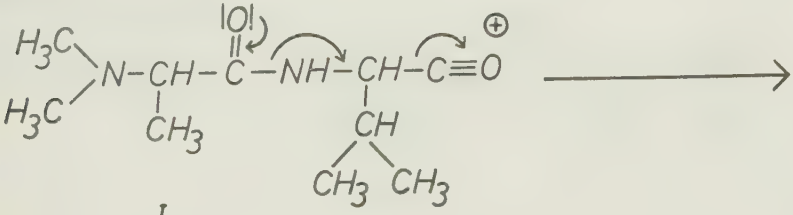


I



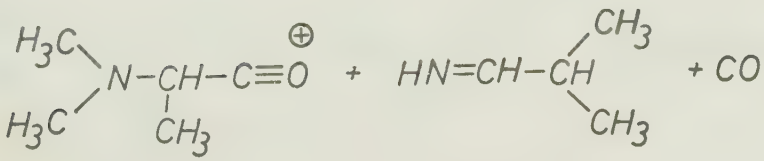
II

Sie können auf verschiedenen Wegen zerfallen. Bei Eliminierung eines Aminosäurerestes auf I entsteht das nächstfolgende Acylium-Ion II :

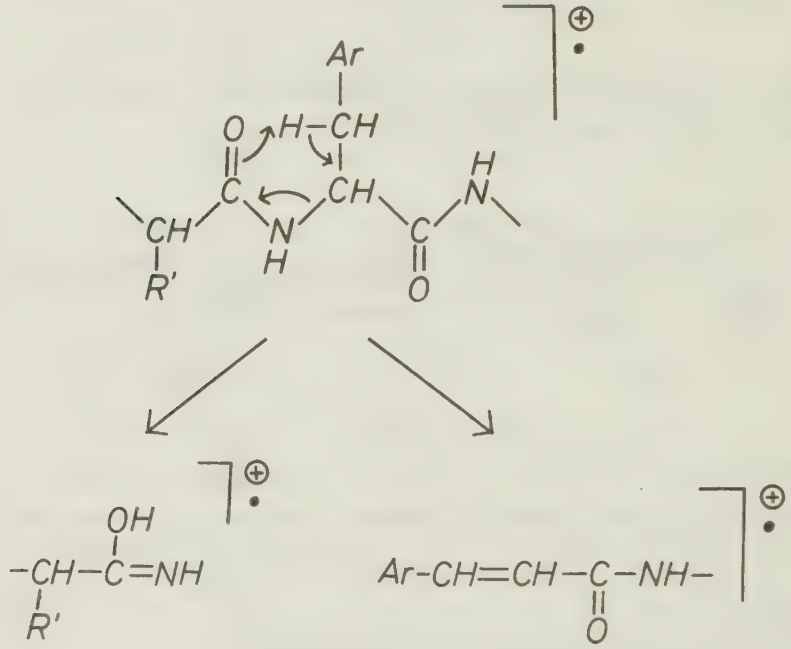


I

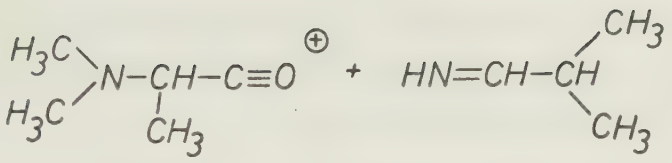
(a)



Bei Peptiden mit aromatischen Aminosäuren kann außer den angeführten Fragmentierungen noch eine Spaltung der N-C-Bindung unter Wasserstoffumlagerung erfolgen :

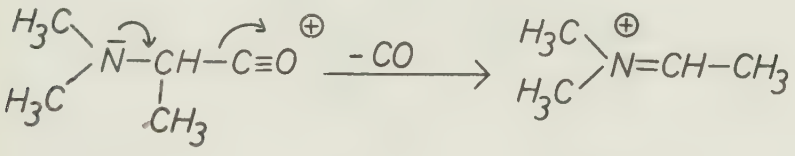


Diese Wasserstoffumlagerung wird z.B. beim methylierten Alanylphenylalanin beobachtet, wie aus dem folgenden Schema 8 zu entnehmen ist.



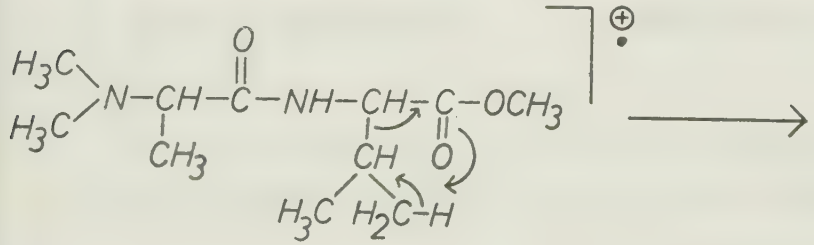
II

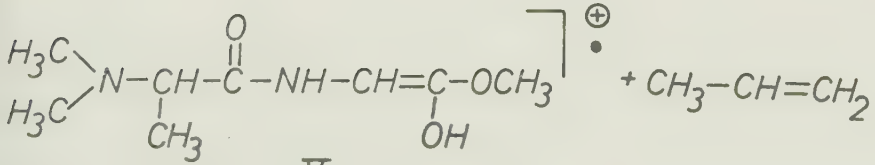
Die Fragmentierung von II nach Reaktion b führt unter CO-Abspaltung zum Immonium-Ion IV :



II IV

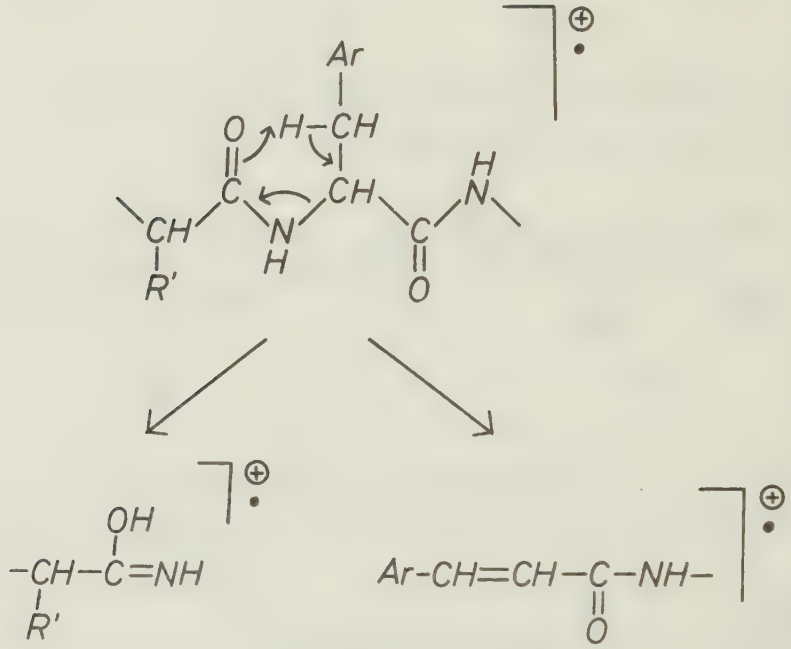
Unter Wasserstoffumlagerung kann das Molekülion die Valinseitenkette eliminieren. Es entsteht das Radikalion m/e 188 (V)





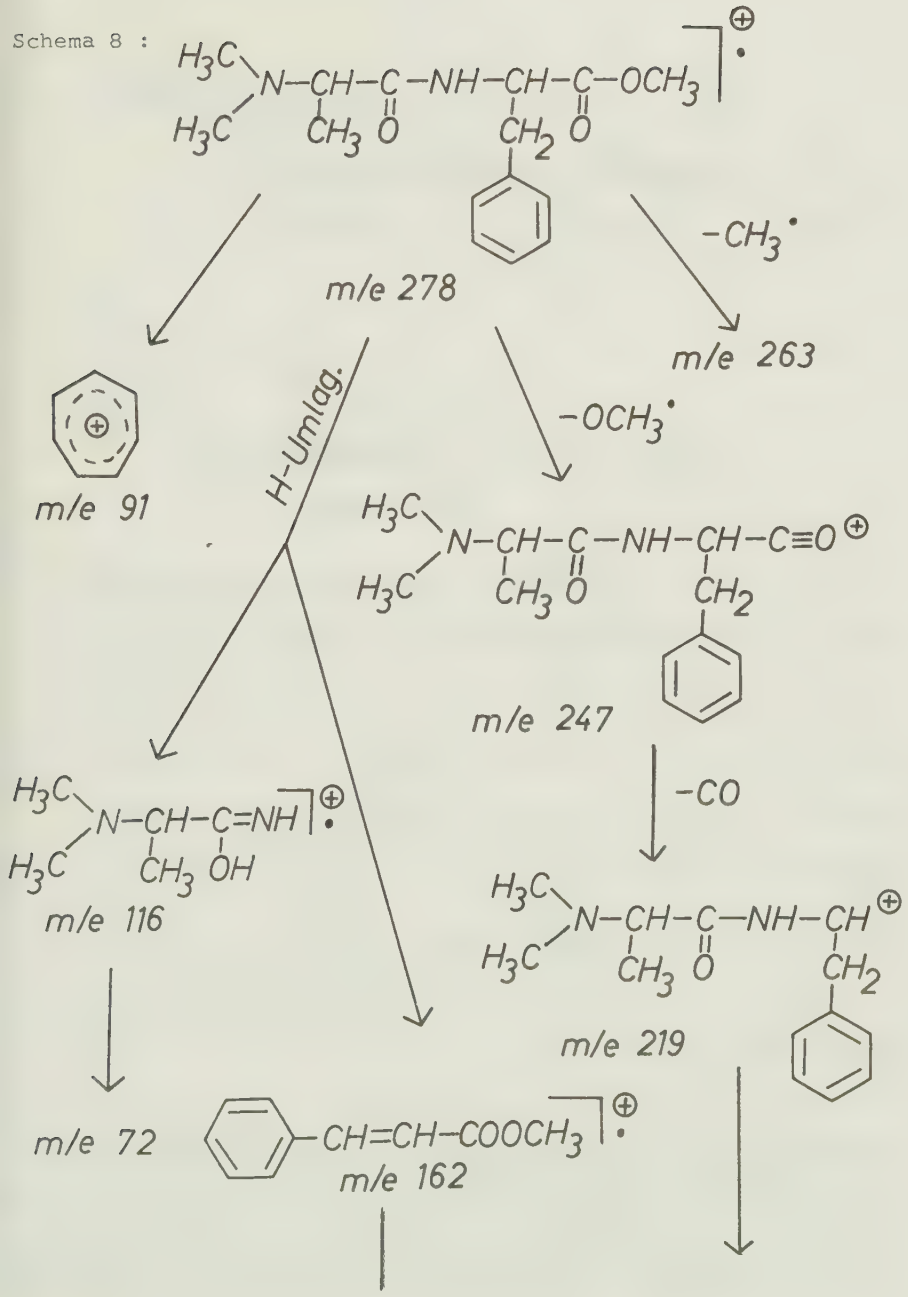
V

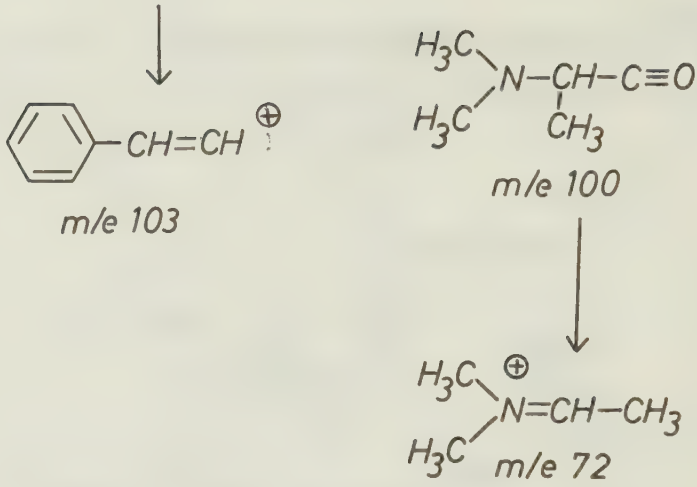
Bei Peptiden mit aromatischen Aminosäuren kann außer den angeführten Fragmentierungen noch eine Spaltung der N-C-Bindung unter Wasserstoffumlagerung erfolgen :



Diese Wasserstoffumlagerung wird z.B. beim methylierten Alanylphenylalanin beobachtet, wie aus dem folgenden Schema 8 zu entnehmen ist.

Schema 8 :

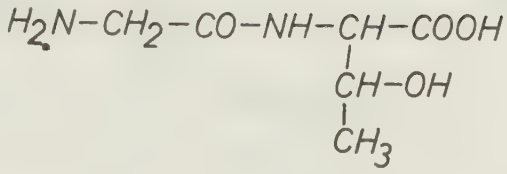

m/e 278
-CH3·
m/e 263
m/e 91
H-Umlag.
-OCH3·
m/e 247
-CO
m/e 116
m/e 219
m/e 72
m/e 162



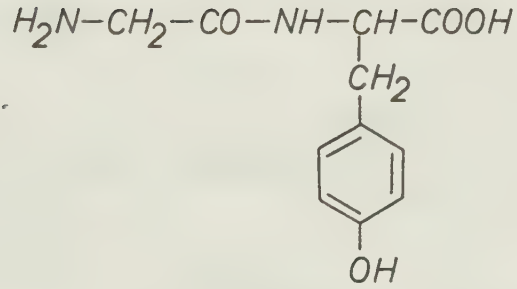
Die einfache Kettenspaltung und die Wasserstoffumlagerungen sind typische Peptidfragmentierungen und werden auch bei Acylderivaten von Peptiden beschrieben [43]. Die Massenspektren verschieden derivatisierter Peptide unterscheiden sich hauptsächlich in Ionen, die das Aminbruchstück der N-terminalen Aminosäure enthalten. So entsteht beim Zerfall des Acylium-Ions II im Alanylvalinderivat das Aminfragment-Ion IV des N-terminalen Alanins. Bildung und Zerfall derartiger charakteristischer Ionen im Massenspektrum können z.T. durch Berechnung der metastabilen Ionen ermittelt werden. Sie sind für die Ableitung der Sequenz ebenso wichtig wie die sichere Identifizierung des Molekülions.

Dipeptide, deren Aminosäuren weitere polare Funktionen enthalten, führte ich durch aufeinander folgende Methylierung und Silylierung in flüchtige Derivate über. Aus der Gruppe dieser Dipeptide untersuchte ich Glycylthreonin (41), Glycyltyrosin (42)

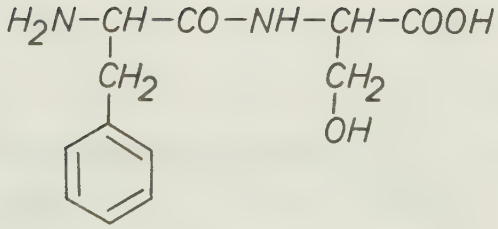
und Phenylalanylserin (43).



41



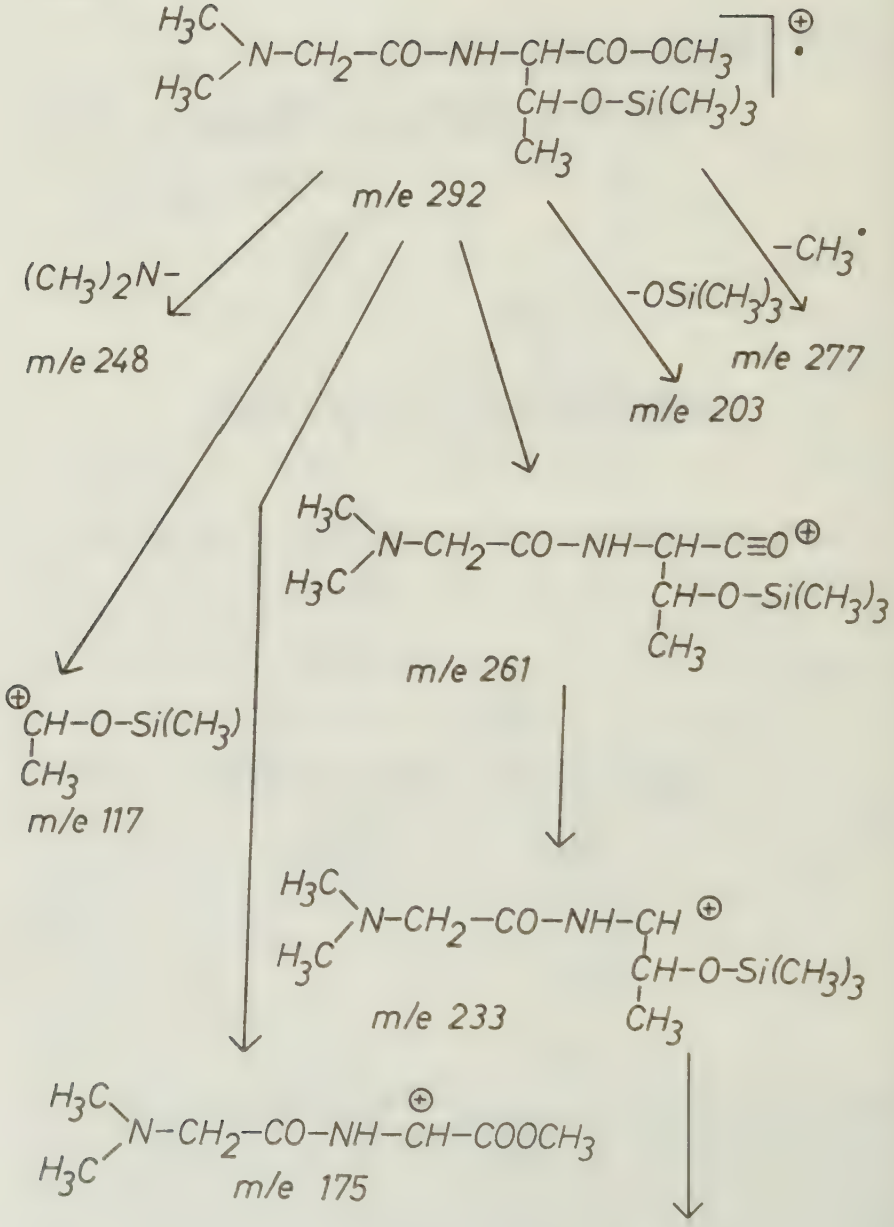
42

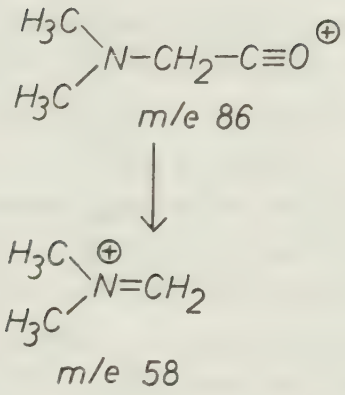


43

Nach Derivatisierung sind sie gaschromatographierbar; ihre Massenspektren zeigen im wesentlichen die bei den Dipeptiden 39 und 40 diskutierten Spaltungen. Den genauen Abbau im Massenspektrometer zeigen die folgenden Schemata 9, 10 und 11.

Schema 9 :


m/e 292
(CH3)2N-
m/e 248
-CH3
-OSi(CH3)3
m/e 277
m/e 203
m/e 261
m/e 117
m/e 233
m/e 175

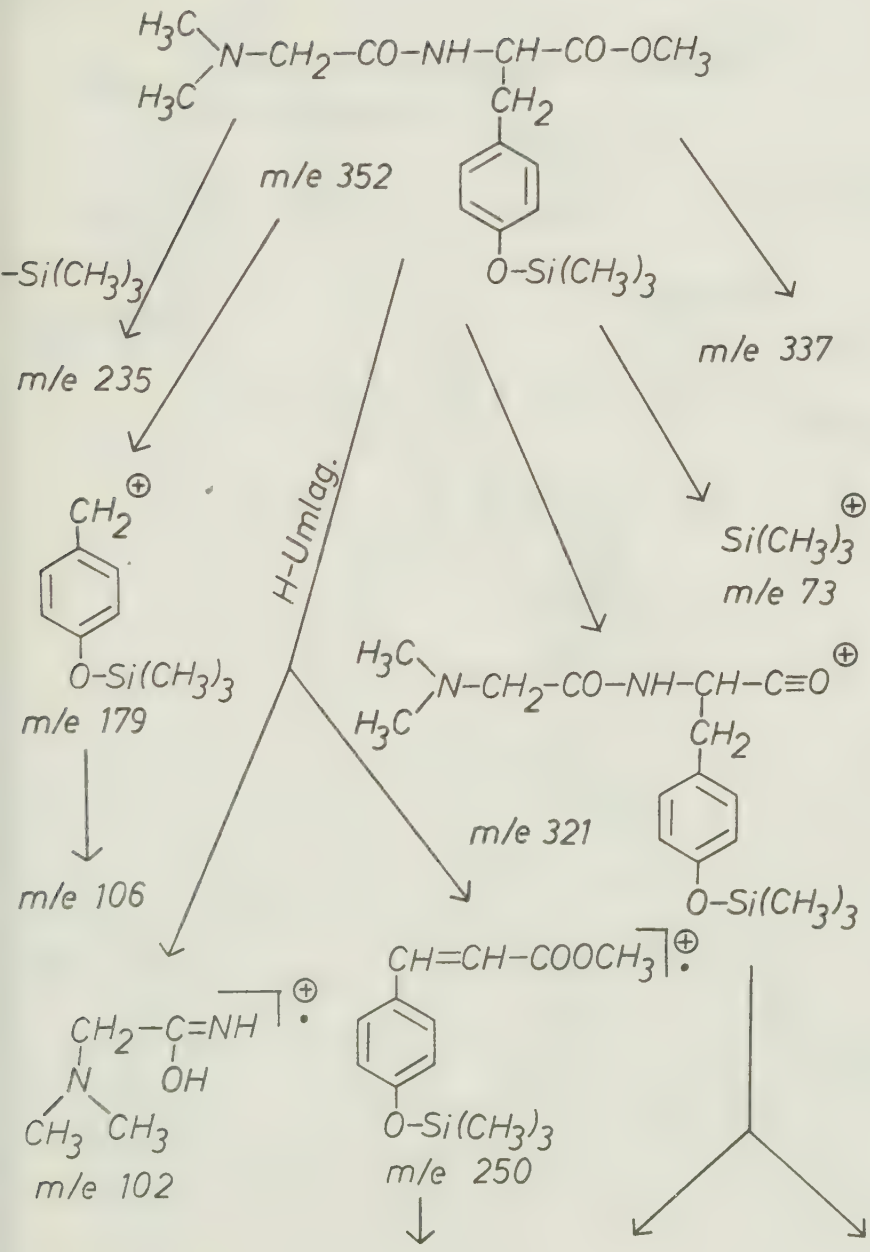


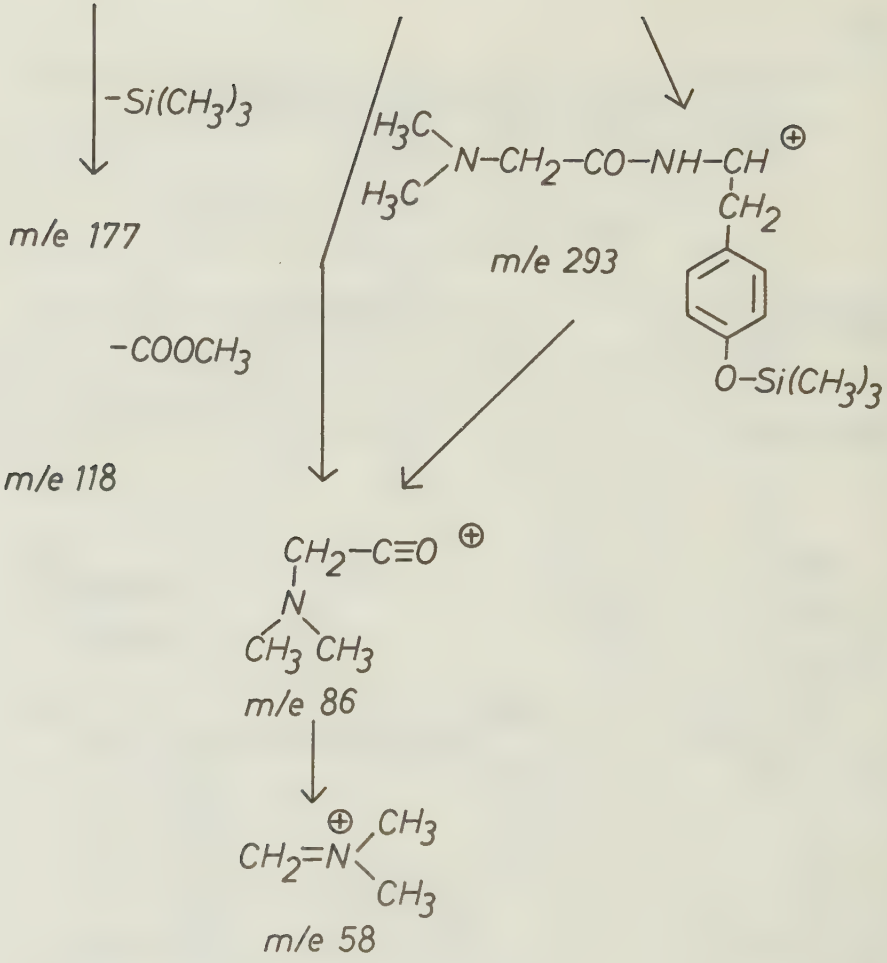
Zur Spaltung an der Carbonylgruppe tritt bei diesen Peptiden die Abtrennung der funktionellen Gruppen in Konkurrenz, z.B. die Eliminierung einer CH_3-Gruppe, eine für Trimethylsilylverbindungen typische Fragmentierung, sowie die Abtrennung der Silylätherfunktion oder der silylierten Aminosäure-Seitenkette. Im Massenspektrum der Derivate von 41 und 42, die beide Glycin als N-terminale Aminosäure enthalten, tritt das Aminfragment-Ion m/e 58 mit der höchsten Intensität auf. Es entsteht aus dem Acylium-Ion m/e 86 durch Verlust von CO. Die Spaltung der N-C-Bindung durch Wasserstoff-Umlagerung und Zerfall der dabei entstehenden Primärbruchstücke führt beim Glycyltyrosinderivat zu Fragmenten hoher Intensität, z.B. zu m/e 102 und m/e 118.

Obwohl Phenylalanylserin eine Aminosäure mit aromatischer Seitenkette enthält, beobachtet man hier keine Wasserstoff-Umlagerung. Bei den beschriebenen Wasserstoff-Umlagerungen wandert stets ein H-Atom in γ-Stellung zur Carbonylgruppe. Da beim Phenylalanylserin Phenylalanin die N-terminale

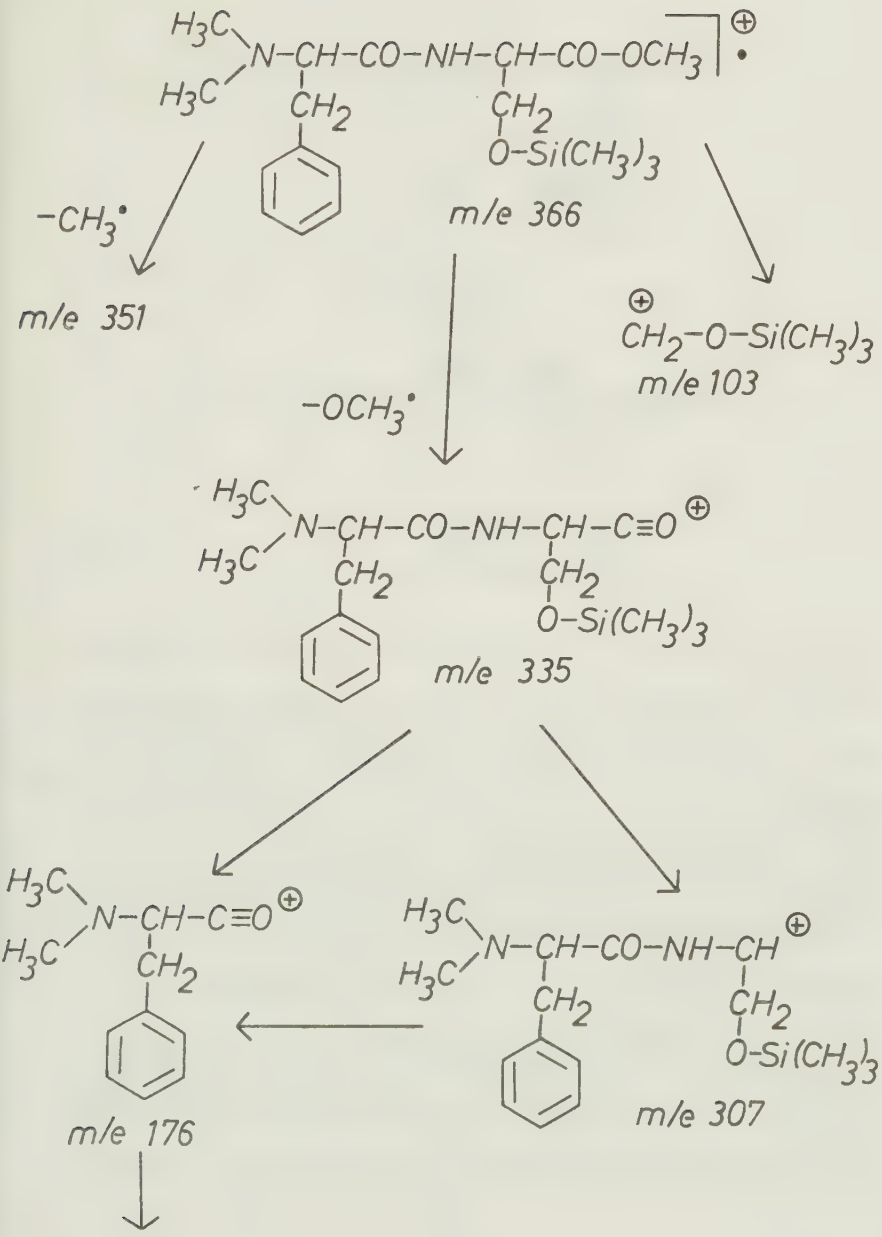
Aminosäure des Dipeptids darstellt, steht keine Carbonylgruppe in der geeigneten Position zur Verfügung. Im Massenspektrum des Phenylalaninderivats ist das Fragment mit der höchsten Intensität das Immonium-Ion der N-terminalen Aminosäure. Es resultiert aus dem weiteren Zerfall des bei der Primärfraktion entstehenden Acylium-Ions m/e 335 (Schema 11). Daneben treten Ionen auf, die durch Spaltung der Aminosäure-Seitenkette gebildet werden, z.B. entsteht durch Abtrennung des Benzylrestes das Bruchstück m/e 175 bzw. das Tropyliumion m/e 91.

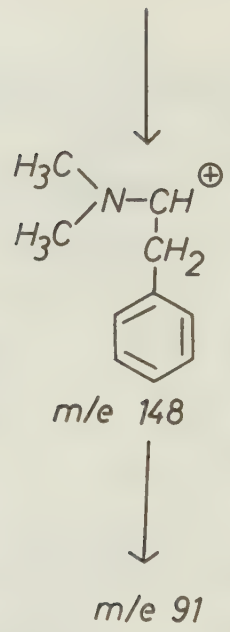
Schema 10 :


m/e 352
m/e 235
m/e 337
m/e 73
m/e 179
m/e 106
m/e 321
m/e 102
m/e 250
H-Umlag.


-Si(CH3)3
m/e 177
-COOCH3
m/e 118
H3C
N-CH2-CO-NH-CH
H3C
CH2
m/e 293
O-Si(CH3)3
CH2-C≡O
N
CH3 CH3
m/e 86
CH2=N
CH3
CH3
m/e 58

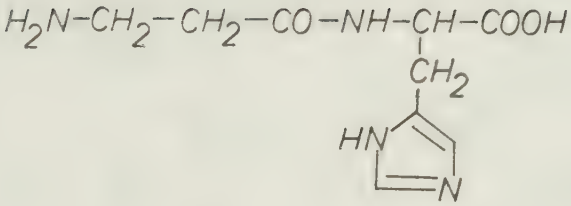
Schema 11 :



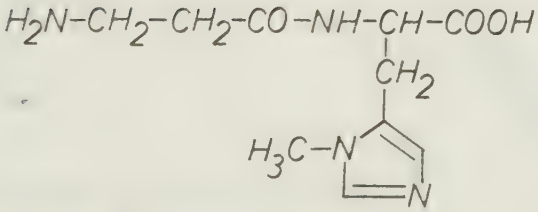


Viele Peptide spielen bei der Aroma- und Geschmacksbildung mikrobiell-enzymatisch gewonnener Lebensmittel eine wichtige Rolle. Im frischen Fleisch sind Aminosäuren und Peptide nur geringfügig vorhanden, bei der Fleischreifung nimmt ihr Gehalt jedoch stark zu, wobei fast alle Aminosäuren des Muskeleiweißes teils frei, teils peptidisch gebunden vorliegen. Sie sind von Bedeutung für den Fleischgeschmack.

Von analytischem Interesse sind die aus β-Alanin und Histidin bzw. Methylhistidin gebildeten Peptide Carnosin (44) und Anserin (45). Sie kommen im Fleisch vor und dienen der Erkennung von Fleischextrakt. Nicht aus Fleisch hergestellte Extrakte und Würzmittel enthalten diese Dipeptide nicht [44].



44

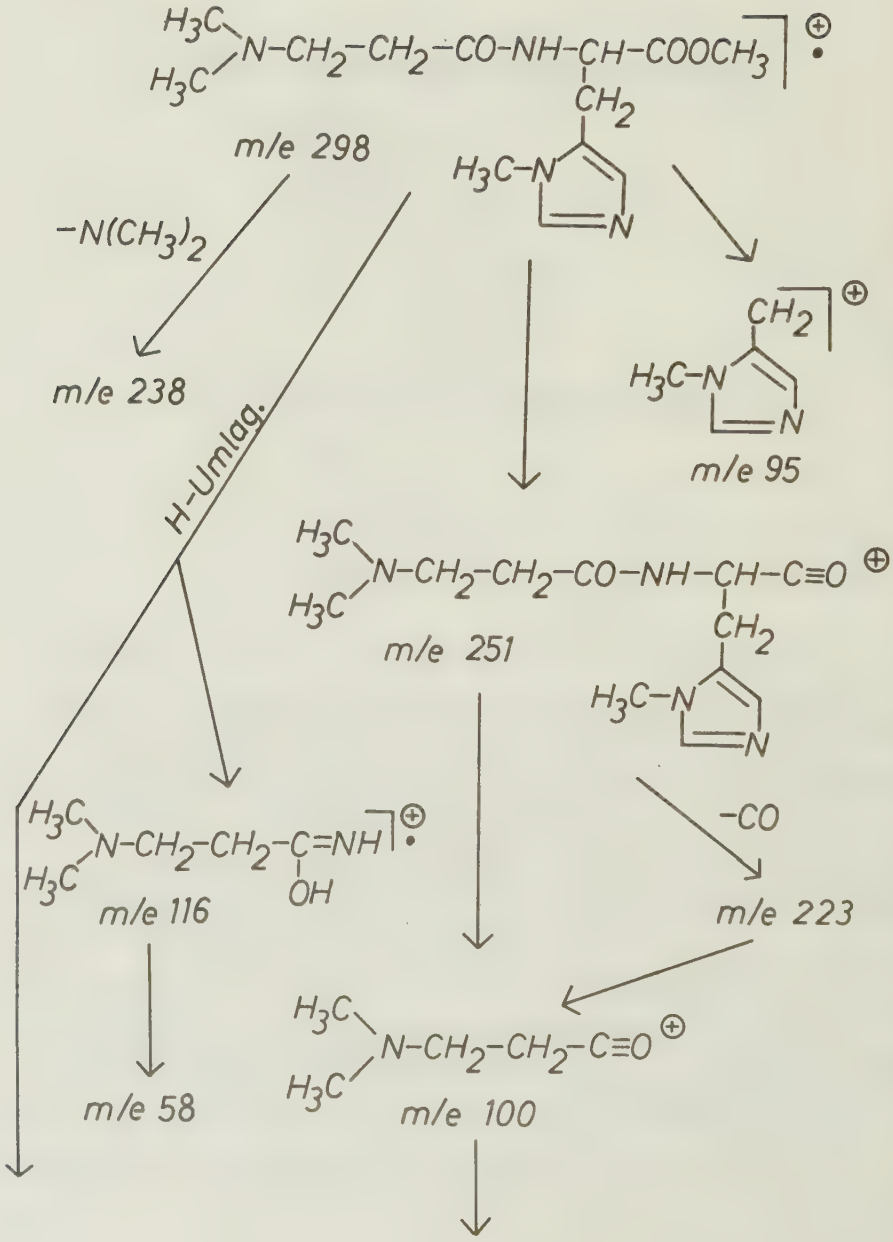


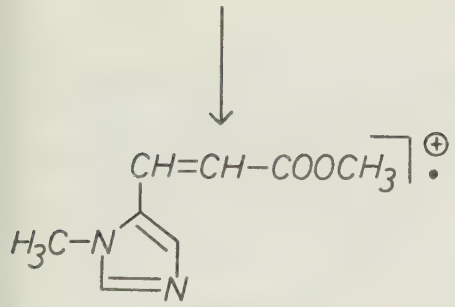
45

Eine gaschromatographische Bestimmung ist bei Carnosin problematisch, da der Imidazolring nur unvollständig derivatisiert werden kann. Diese Schwierigkeit wurde bei der Histidinderivatisierung bereits diskutiert. Im Anserin liegt der Imidazolring methyliert vor. Nach Veresterung mit methanolischer HCl und Methylierung der Aminogruppe ist diese Verbindung gaschromatographierbar.

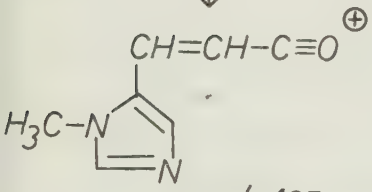
Das Massenspektrum von N,N-Dimethylanserinmethylester zeigt die bekannten Zerfallswege :

Schema 12 :


m/e 298
-N(CH3)2
m/e 238
H-Umlag.
m/e 95
m/e 251
-CO
m/e 223
m/e 116
m/e 58
m/e 100

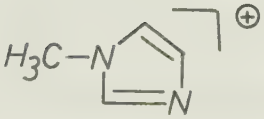


m/e 166

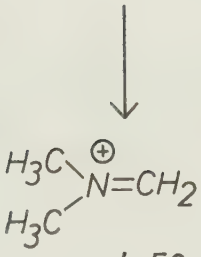


m/e 135

m/e 107



m/e 81



m/e 58

Die derivatisierten Peptidmethylester sind polare Verbindungen, deren Dampfdruck mit wachsender Zahl von Peptidbindungen abnimmt. Man gelangt rasch in einen Bereich, wo ihre Flüchtigkeit für eine gaschromatographische Bestimmung nicht mehr ausreicht. Das bislang größte gaschromatographisch nachgewiesene Peptidbruchstück war ein Pentapeptid [45]. Um höhermolekulare Peptide der Gaschromatographie noch zugänglich zu machen, hat man diese verestert, trifluoracetyliert und dann alle Säureamidgruppen mit Natriumhydrid und Methyljodid methyliert [46].

Bei der Umsetzung von Peptidestern mit Natriumcyanoborhydrid / Formaldehyd wurde die Amidbindung unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht methyliert. Auch andere Reaktionsbedingungen wie Erwärmen der Reaktionslösung, Änderung von pH-Wert und Konzentration der Komponenten führten nicht zur Alkylierung.

Auch der Versuch, Benzamid mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid zu methylieren, verlief nicht befriedigend. In guten Ausbeuten (ca. 90%) isolierte ich N-Monomethylbenzamid. Die Einführung einer zweiten Methylgruppe gelang auf diese Weise nicht. Nach Böhme lassen sich N-Methylcarbonsäureamide durch Erhitzen mit Paraformaldehyd im Einschlußrohr auf 120 - 150°C oder bei Gegenwart geringer Mengen Kaliumcarbonat auf 110°C in N-Hydroxymethyl-N-methylamide überführen [47]. Allerdings sind diese Produkte nicht isolierbar, sondern nur durch weitere Umsetzungen nachweisbar. Ich versuchte, N-Hydroxymethyl-N-

methylbenzamid unter den von Böhme genannten Bedingungen herzustellen. Anschließende Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid sollte N,N-Dimethylbenzamid ergeben. Ich konnte dieses Produkt aber nicht nachweisen.

VII. Aminosäureanalyse in Lebensmitteln

Die ausgearbeitete Methode der gaschromatographischen Analyse von Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäureester setzte ich zur Untersuchung verschiedener Lebensmittel ein. Ich ermittelte die Aminosäurespektren von Fleisch, Fleischextrakt, Brüherzeugnissen, Soßen, Suppen, Käse und Krabbenextrakt.

1. Untersuchung von Liebigs Fleischextrakt

Fleischextrakt ist ein im wesentlichen fett- und proteinfreies Konzentrat der wasserlöslichen Bestandteile des Rindfleisches. Angeregt durch die vielen Berichte über seine physiologischen Wirkungen führten Chemiker ausgedehnte Untersuchungen über die stoffliche Zusammensetzung aus. Mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie bestimmten Baltes [48] und Sulser [49] den Aminosäuregehalt in käuflichen Fleischextrakten. Sie fanden, daß unter den frei vorliegenden Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und Taurin dominieren. Von den peptidisch gebundenen herrschen außer Histidin und β-Alanin, den Dipeptidkomponenten, Glutaminsäure und Glycin vor. Lysin, Serin, Methionin und Leucin treten in geringeren Konzentrationen auf. Diese Ergebnisse konnte ich durch die gaschromatographische Aminosäureanalyse im wesentlichen bestätigen. Allerdings erfaßte ich mit den angewandten Methoden Taurin und Histidin nicht.

Um die Leistungsfähigkeit des neu erarbeiteten Verfahrens der Aminosäurederivatisierung durch Veresterung, Methylierung und

anschließende Silylierung zu prüfen, bestimmte ich die Aminosäuren in Fleischextrakt zusätzlich als N-Trifluoracetyl-aminosäureester. Die Trifluoracetylierung der Aminogruppe zur Derivatisierung war von Weygand [50] eingeführt worden. Der Arbeitskreis um Gehrke befaßte sich dann intensiv mit dieser Schutzgruppe und mit der gaschromatographischen Trennung der N-Trifluoracetylderivate. Das beste Resultat, nämlich die Trennung von 20 Aminosäurederivaten, brachte der Einsatz einer 10% Apiezon M -Säule. Allerdings konnten Methionin, Cystein und Histidin mit dieser Säule nicht quantitativ bestimmt werden [51]. Mit den im Handel erhältlichen Apiezon M -Säulen ist diese Trennung der N-Trifluoracetylaminosäurebutylester schwer nachzuvollziehen. Ich konnte trotz Anwendung verschiedener Apiezon M -Säulen die von Gehrke beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigen. Dieses Problem ist in der Literatur bekannt. Man nimmt an, daß hier das Trägermaterial in den Trennvorgang dieser Aminosäurederivate direkt eingreift. Denn in Abhängigkeit von nur geringfügigen Änderungen der Belegung beobachtet man eine starke Änderung der Trennung von bestimmten Aminosäurepaaren [52]. Dasselbe stellte man bei verschiedenen Trocknungsbedingungen des Trägermaterials vor der Belegung fest [53]. Angesichts der wechselnden Qualität des käuflichen Trägermaterials sind diese Trennprobleme verständlich.

Bei der Bestimmung der Aminosäuren als N-Trifluoracetylderivate in Liebigs Fleischextrakt wählte ich eine OV 210 -Säule und eine OV 17 -Säule. Bei Anwendung dieser beiden Säulen lassen sich die im Fleischextrakt auftretenden Aminosäuren und

Säuren befriedigend trennen. Lediglich Leucin und Isoleucin erscheinen bei beiden Säulen als ein Peak. Auf einer 2,5% OV 17 -Säule von 2,5 m Länge erscheinen die Derivate von Alanin und Threonin sowie von Glycin und Serin als ein Peak. Mit einer 3% OV 210 -Säule (4m) lassen sich Alanin und Threonin, Glycin und Serin trennen. Dagegen überlagern sich Methionin und Hydroxyprolin.

Die gaschromatographische Trennung der N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylester führte ich mit einer 5% SE 52-Säule durch.

Zu Beginn der Untersuchung von Liebigs Fleischextrakt extrahierte ich die Probe erschöpfend mit Methylenchlorid, um lipophile Bestandteile abzutrennen. Ein Teil der Rückstandes wurde dann 24 Stunden mit 6 N HCl bei 100°C unter N_2-Atmosphäre hydrolysiert. Bei diesen Bedingungen werden Proteine vollständig in die Aminosäuren gespalten [54]. Eine Hydrolyse mit alkoholischer HCl erscheint rationeller, da dann die Aminosäuren gleichzeitig verestert werden. Ein Versuch mit methanolischer 6 N HCl zeigte jedoch, daß selbst bei längerer Reaktionszeit nicht alle Peptidbindungen gespalten werden. Die gleiche Erfahrung machte Gehrke bei Hydrolyse mit butanolischer HCl [55].

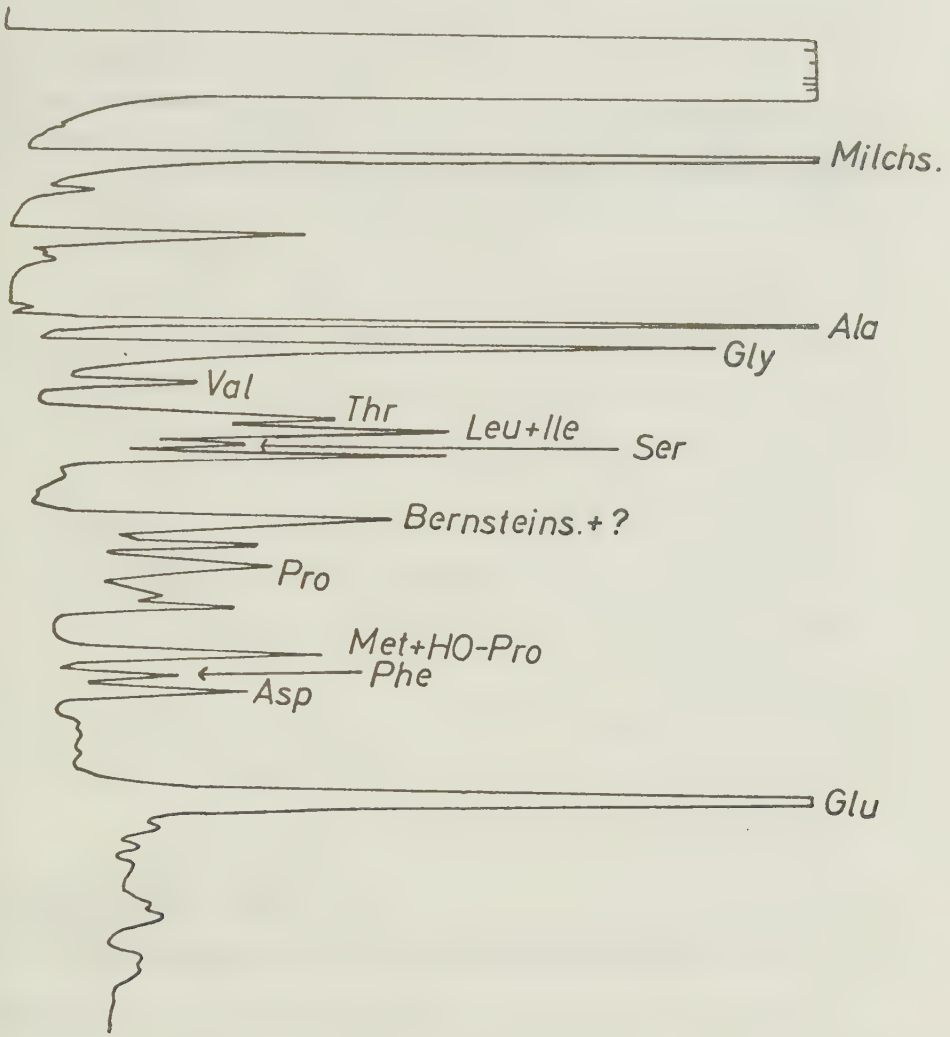
Das eingeengte Hydrolysat des Fleischextrakts neutralisierte ich und dampfte im Vakuum zur Trockene ein. Die Aminosäureanalyse wurde nun mit diesem Rückstand und auch mit der entfetteten nicht hydrolysierten Substanz durchgeführt, und zwar jeweils nach zwei Methoden. Einmal derivatisierte ich die

Aminosäuren nach Veresterung mit Trifluoracetanhydrid und einmal methylierte und silylierte ich die Proben nach dem Verestern.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gaschromatogramme der derivatisierten Proben.

Abb. 8 : GC-Analyse von Liebigs Fleischextrakt, ohne Hydrolyse, Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester; Säule: 3% OV 210 auf 80-100 mesh Chromosorb W HP, 4 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

Abb. 8 :


Milchs.
Ala
Gly
Val
Thr
Leu+Ile
Ser
Bernsteins.+?
Pro
Met+HO-Pro
Phe
Asp
Glu

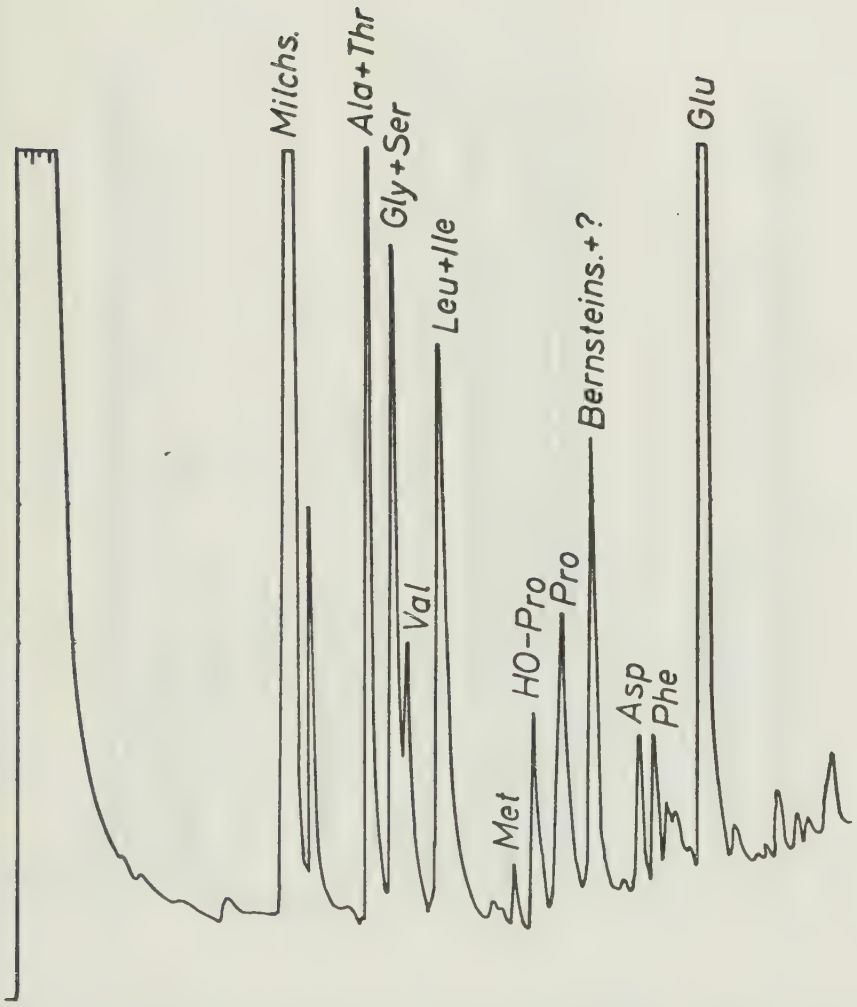


Abb. 9 : GC-Analyse von Liebigs Fleischextrakt, ohne Hydrolyse, Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester; Säule: 2,5% OV 17 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

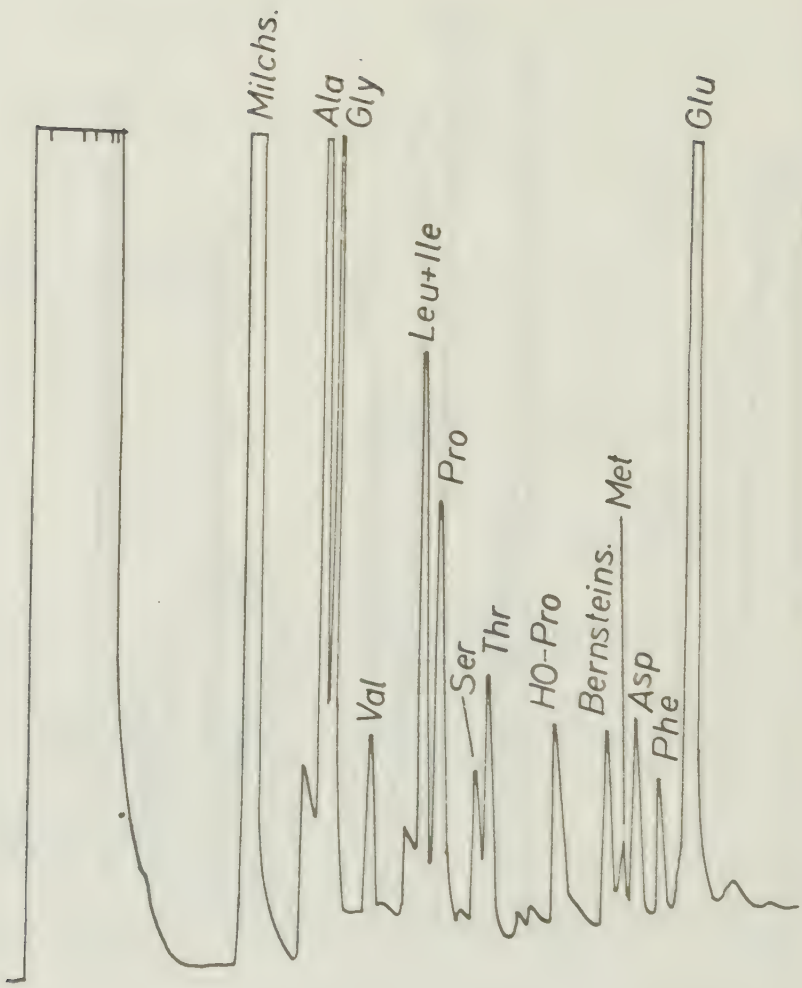


Abb. 10 : GC-Analyse von Liebigs Fleischextrakt, ohne Hydrolyse. Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester: Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

Abb. 11 : DC-Analyse von käufl. Fleischextrakt, hydrolysiert, Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester; Säule: 3% OV 210 auf Si-110 mesh Chromosorb W HP, 4 m x 1/8", Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

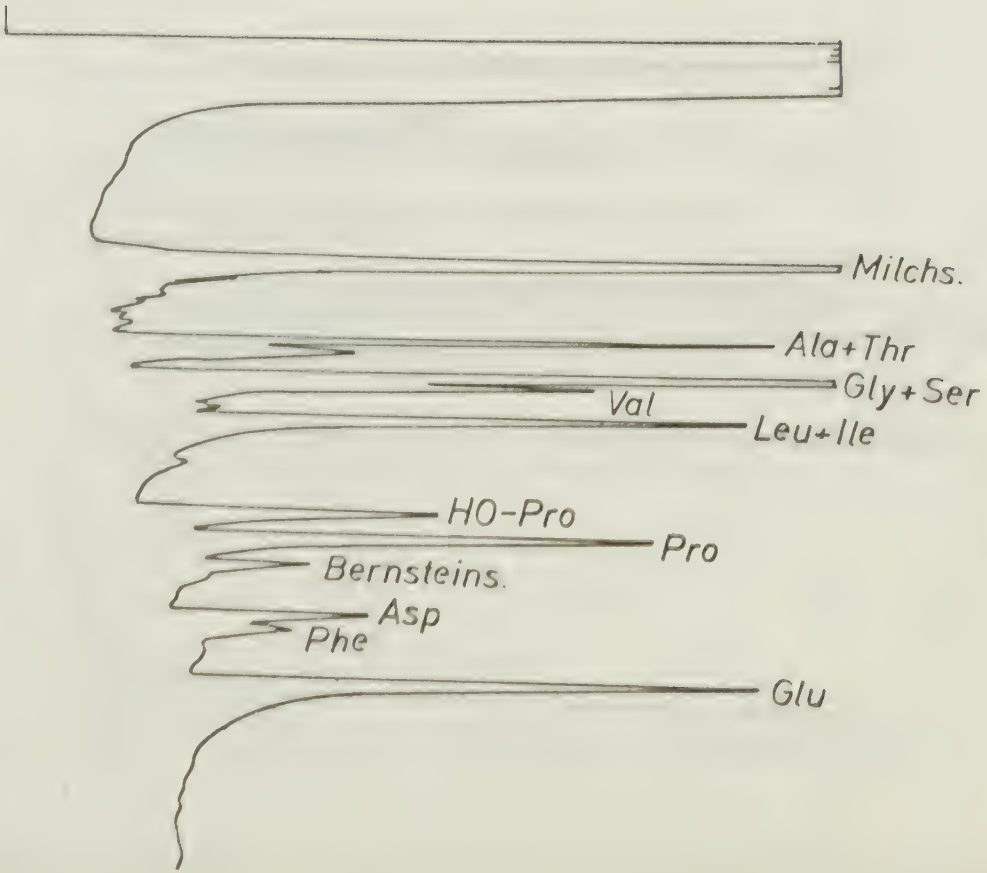

Milchs.
Ala+Thr
Gly+Ser
Val
Leu+Ile
HO-Pro
Pro
Bernsteins.
Asp
Phe
Glu

Abb. 11 : GC-Analyse von Hanuja Fleischextrakt, cyclisiert, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-Cl1-trimethylsilylbutylester: Säule: SE 52 12 m (100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 mm x 1/8"), Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min.

Die beiden gaschromatographischen Verfahren liefern gut übereinstimmende Ergebnisse. In den Gaschromatogrammen des nicht hydrolysierten Fleischextraktes treten Glycin, Alanin und Glutaminsäure als größte Peaks auf. Die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Prolin, Hydroxyprolin, Methionin, Phenylalanin und Asparaginsäure kommen in geringeren Mengen vor. Nach der Hydrolyse dominiert Glycin im Aminosäurespektrum. Im Vergleich zu Glutaminsäure ist die Konzentration an Prolin, Hydroxyprolin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Serin und Threonin nach der Hydrolyse erhöht.

Hinsichtlich der Qualtitätsbeurteilung von Fleischextrakten kommt Hydroxyprolin eine besondere Bedeutung zu. Bei längerer Hitzeeinwirkung auf Fleisch entsteht aus dem Bindegewebeprotein Kollagen durch Denaturierung lösliche Gelatine, die je nach Temperatur und Säuregrad proteolytisch abgebaut wird. Derartige Abbauprodukte verleihen dem Fleischextrakt erhöhte Viskosität und leimigen Geschmack. Der Gehalt an Gelatine und ihren Abbauprodukten läßt sich nach vollständiger Hydrolyse des Extrakts über die Konzentration an Hydroxyprolin errechnen, das im Kollagen als spezifische Aminosäure in konstanter Menge vorkommt.

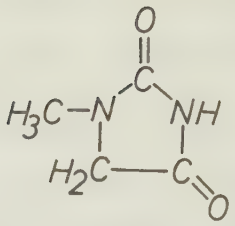
Sulser fand in käuflichen Fleischextrakten einen Gehalt an freiem Hydroxyprolin von weniger als 0,05 % [56)]. In etwa gleicher Konzentration stellte er Methionin und Phenylalanin fest. Die Gaschromatogramme des von mir untersuchten Fleischextrakts zeigen für Hydroxyprolin einen größeren Peak als für Methionin und Phenylalanin. Dies deutet darauf hin, daß

Hydroxyprolin in der Probe in größerer Menge vorliegt als bei Sulser für Fleischextrakt angegeben ist. Eine konkrete Aussage kann jedoch nur nach einer quantitativen gaschromatographischen Analyse mit Eichgemisch gemacht werden.

Für peptidisch gebundenes Hydroxyprolin gibt der gleiche Autor Werte bis 0,5 % an [57]. Addiert man den Gehalt an freiem Hydroxyprolin hinzu, so werden im Hydrolysat bis zu 0,55 % Hydroxyprolin gefunden. Bei Serin und Threonin liegen die entsprechenden Konzentrationen bei 0,5-0,7 % und bei 0,4-0,7 %, also etwa im gleichen Bereich wie die von Hydroxyprolin. Dieses Ergebnis wird durch Interpretation der abgebildeten Gaschromatogramme bestätigt. Ein grober Vergleich der Peakhöhen zeigt, daß die Konzentrationen an Serin, Threonin und Hydroxyprolin im untersuchten Hydrolysat in der gleichen Größenordnung liegen.

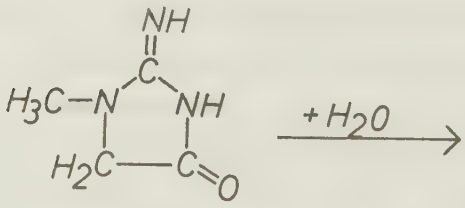
An N-freien organischen Bestandteilen sind Milch- und Bernsteinsäure seit langem als Extraktstoffe des Fleisches bekannt. Bei den beschriebenen gaschromatographischen Verfahren werden sie als Butylester erfaßt.

Den eingeengten Methylenchlorid-Auszug des Fleischextraktes unterwarf ich einer Hochvakuumdestillation. Bei 110°C scheiden sich farblose Kristalle in der luftgekühlten Vorlage ab. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 156°C. Eine Lösung der Verbindung gibt beim Chromatographieren mit einer 2,5% SP 1000 - Säule einen Peak. Durch Anwendung der Kombination Gaschromatograph / Massenspektrometer wurde die Substanz als N-Methylhydantoin (46) identifiziert.

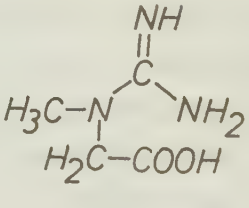


46

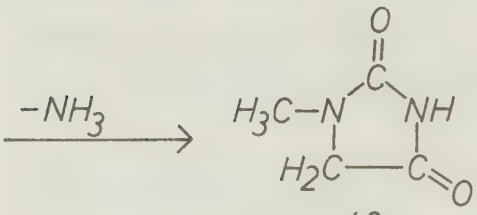
N-Methylhydantoin, das bisher in Fleischextrakten noch nicht sicher nachgewiesen werden konnte, wird als Reaktionsprodukt von Kreatinin (47) und Kreatin (48) angesehen :



47



48



46

Um sicher zu gehen, daß sich 46 nicht bei der Hochvakuum-destillation bildet, sondern schon im Fleischextrakt vorliegt, untersuchte ich den Methylenchloridauszug des Fleischextrakts direkt gaschromatographisch. Auch dieses Gaschromatogramm zeigte einen Peak für N-Methylhydantoin.

2. Untersuchung einer flüssigen Würze

Während Fleischextrakt als reines Fleischerzeugnis anzusprechen ist, sind Würzen Hydrolysate proteinhaltiger Stoffe überwiegend nichttierischen Ursprungs. Als hauptsächlichste Eiweißträger dienen Weizen- und Maiskleber sowie die Extraktionsschrote von Erdnuß und Soja.

Bereits Berzelius stellte fest, daß proteinhaltige Materialien, die mit starken Säuren hydrolysiert werden, einen an Fleisch erinnernden bouillonartigen Geschmack annehmen. Geschmack und Aroma dieser Produkte werden zum einen durch Reaktionsprodukte von Aminosäuren mit Zuckern bestimmt, zum anderen durch die Aminosäuren selbst. Diese Aminosäuren bestimmte ich gaschromatographisch als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilybutylester.

Aus dem nachstehenden Chromatogramm geht hervor, daß Glutaminsäure in hoher Konzentration vorliegt, gefolgt von Asparaginsäure und Prolin. In geringerer Menge werden Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin und Serin festgestellt.

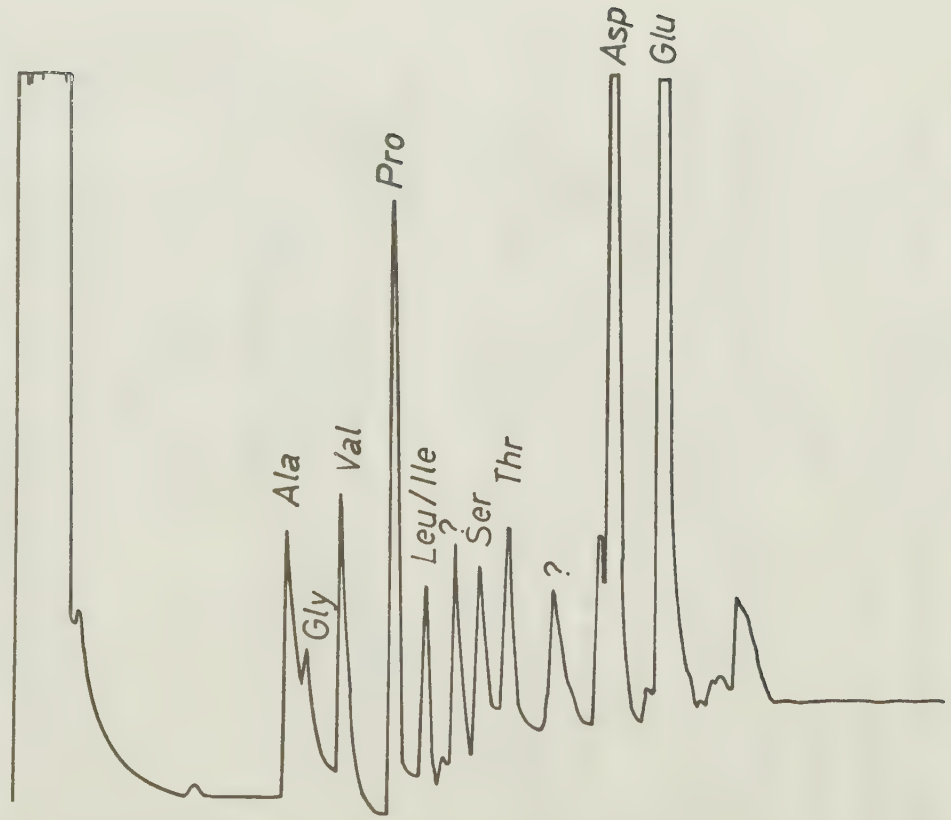


Abb. 14 : GC-Analyse einer flüssigen Würze, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

3. Untersuchung von gekörnter Brühe

Gekörnte Brühe zählt zur Gruppe der Brüherzeugnisse. Dies sind Zubereitungen, die, mit Wasser überbrüht, fertige Fleischbrühe bzw. fleischbrühartige Aufgüsse ergeben oder auch wie Würzen Verwendung finden. Sie stellen Mischungen von Fleischextrakt mit Würzen und Kochsalz dar.

Die gekörnte Brühe kommt in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung der Würze sehr nahe. Glutaminsäure und Asparaginsäure geben auch im Chromatogramm der gekörnten Brühe die stärksten Peaks. Aus der Höhe der Peaks von Glycin, Alanin, Leucin / Isoleucin und Prolin kann man schließen, daß diese Aminosäuren in den gleichen Mengen vorliegen wie in der Würze. Lediglich die Konzentrationen an Threonin und Serin sind in der Brühe höher als in der Würze. Das Auftreten eines Hydroxyprolin-Peaks ist ein Hinweis dafür, daß das Produkt Fleischextrakt enthält.

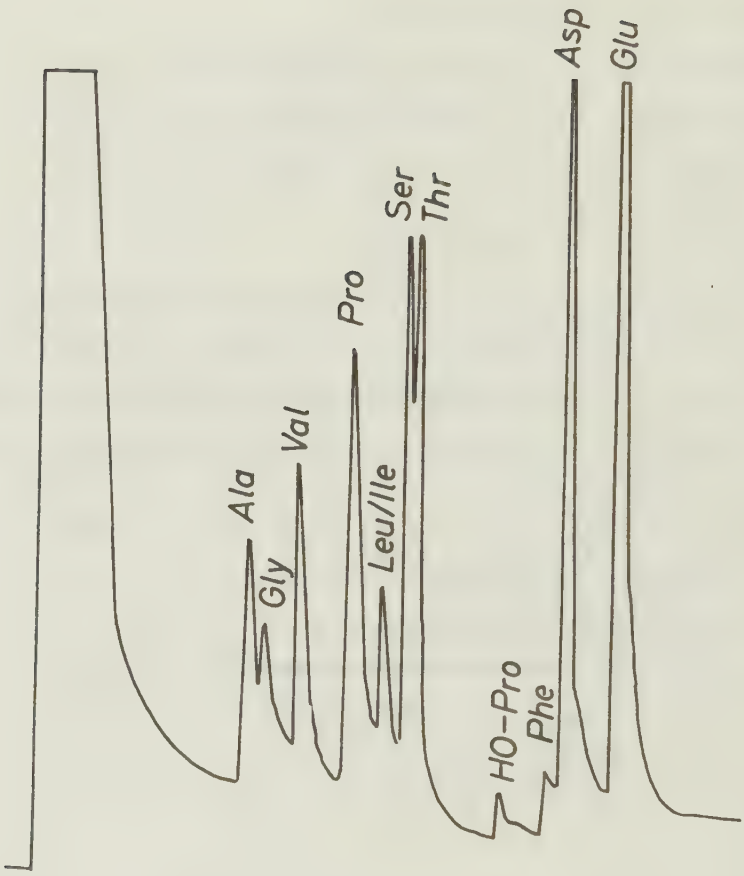


Abb. 15 : GC-Analyse von gekörnter Brühe; Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min.

4. Untersuchung von klarer Fleischsuppe

Eine klare Fleischsuppe, die im Handel in Form von Würfeln angeboten wird, wurde durch Extraktion mit Methylenchlorid entfettet. Durch Umsetzung des Rückstandes mit butanolischer HCl, mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid und mit einem Silylierungsmittel wurden die frei vorliegenden Aminosäuren derivatisiert. Eine gaschromatographische Analyse ergab dann die in Abbildung 16 dargestellte Aminosäurezusammensetzung.

Das untersuchte Produkt zeichnet sich durch einen sehr hohen Glutaminsäuregehalt aus. Weder in Liebigs Fleischextrakt noch in der analysierten Würze wurde eine derartige Glutaminsäurekonzentration beobachtet. Es wurde offensichtlich Glutaminsäure zugegeben. Sie wird oft in Form ihres Mononatriumsalzes Fleischzubereitungen, Suppen und Würzen zugesetzt, um das Eigenaroma der Lebensmittel zu verstärken.

Im übrigen treten bei der Fleischsuppe die gleichen Aminosäuren auf wie im Fleischextrakt, aber in geringerer Menge.

Zum Vergleich stellte ich eine klare Fleischsuppe aus Rindfleisch her. Dazu kochte ich ein mageres Bruststück vom Rind 1,5 Stunden in Wasser. Die erhaltene Suppe filtrierte ich und extrahierte das Fett mit Methylenchlorid. In der zurückbleibenden Substanz wurden die freien Aminosäuren bestimmt.

Aus dem abgebildeten Chromatogramm (Abb. 17) ist ersichtlich, daß in der selbstgekochten Suppe weniger Glutaminsäure enthalten ist als in der gekauften. Insgesamt entspricht das Aminosäurespektrum etwa dem von Liebigs Fleischextrakt.

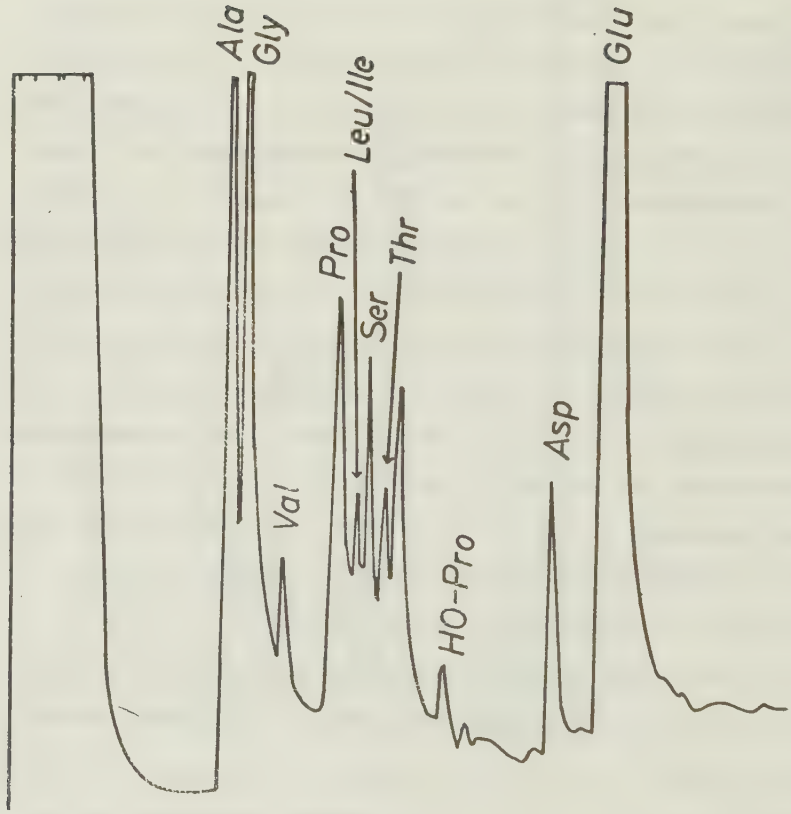


Abb. 16 : GC-Analyse von klarer Fleischsuppe, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

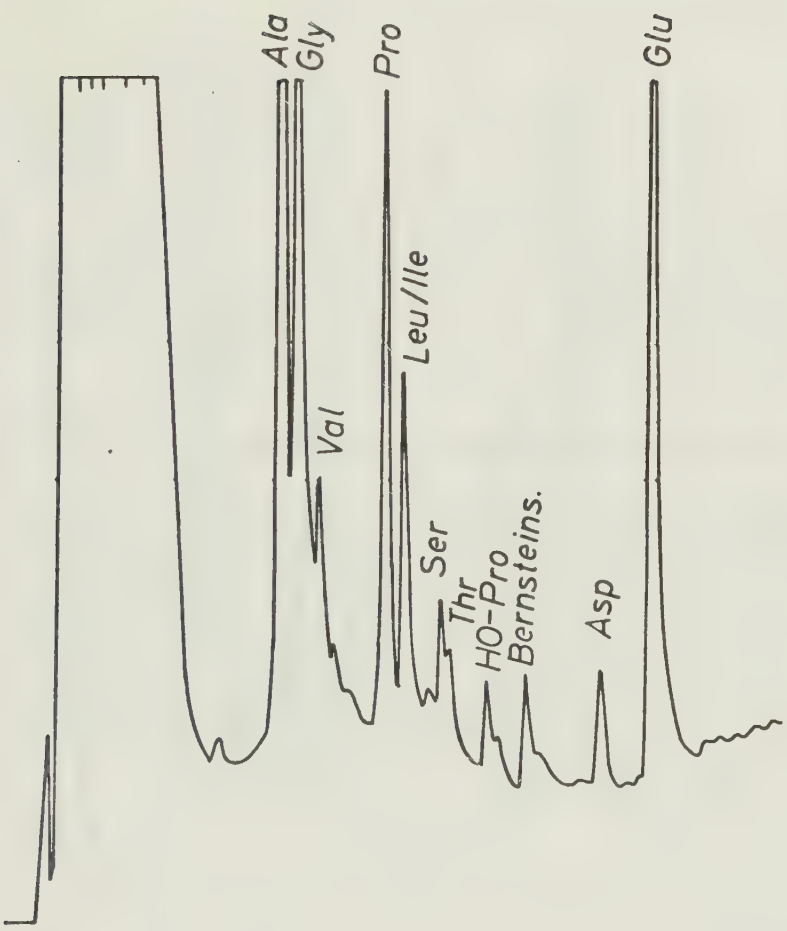


Abb. 17 : GC-Analyse einer mit Rindfleisch hergestellten Fleischsuppe, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

5. Untersuchung von Hühnersuppe

Das ermittelte Spektrum an freien Aminosäuren in Hühnersuppe (Abb. 18) ähnelt sehr stark dem der gekauften klaren Fleischsuppe. Neben Glutaminsäure, die auch hier wieder als Aminosäure mit der höchsten Konzentration auftritt, findet man die gleichen Aminosäuren wie in den meisten der bereits beschriebenen Produkte, nämlich Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Serin, Threonin und Asparaginsäure.

6. Untersuchung einer Champignon-Creme-Suppe

Champignon-Creme-Suppe zählt zur Gruppe der gebundenen Suppen. Gegenüber Glutaminsäure treten die übrigen Aminosäuren im erstellten Gaschromatogramm (Abb. 19) in den Hintergrund. In geringerer Konzentration als bei den bisher untersuchten Lebensmitteln konnten Glycin, Alanin, Valin, Prolin, Leucin, Isoleucin und Asparaginsäure nachgewiesen werden. Threonin und Serin wurden nicht gefunden.

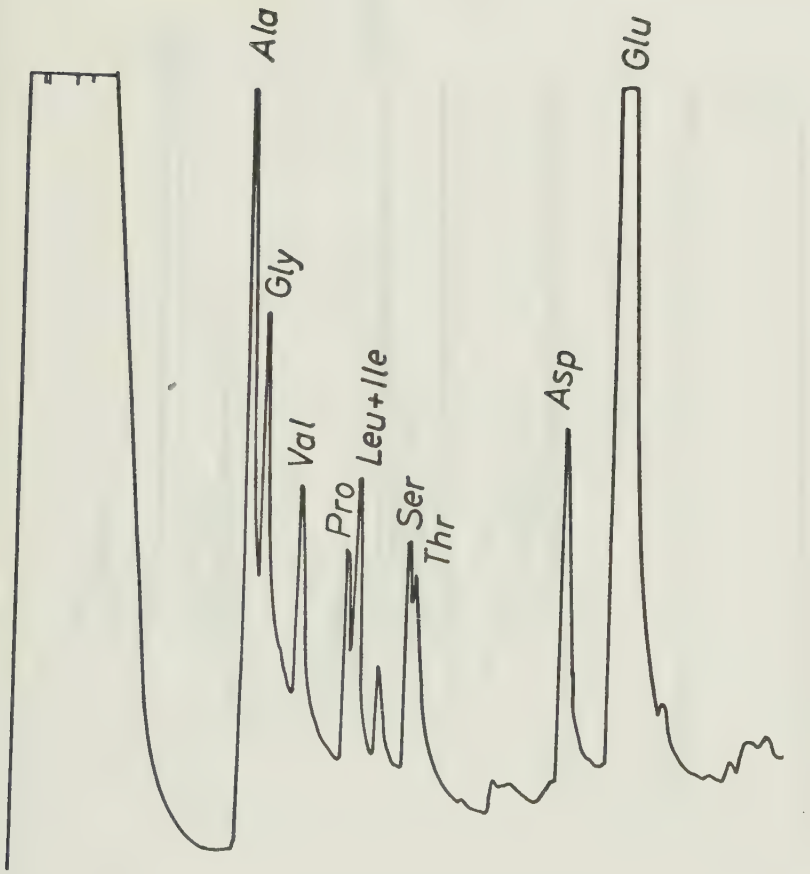


Abb. 18 : GC-Analyse einer Hühnersuppe, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

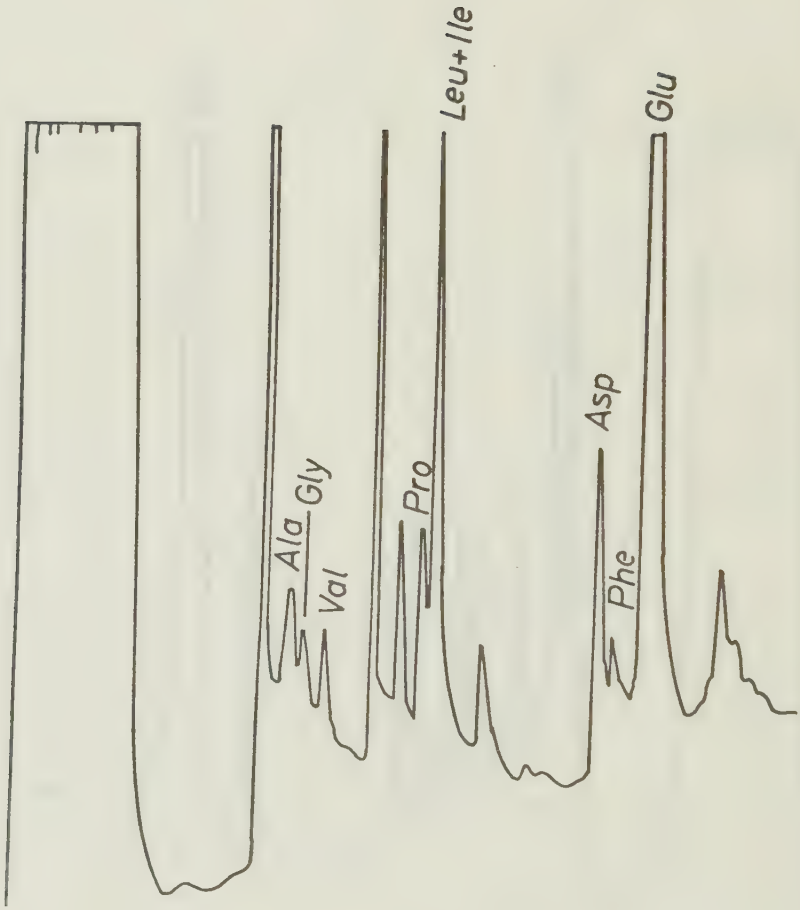


Abb. 19 : GC-Analyse einer Champignon-Creme-Suppe, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

7. Untersuchung von Bratensoßen

Die Soßen sind den gebundenen Suppen verwandt. Bei der industriellen Herstellung von Suppen und Soßen spielen Fleischextrakte, Würzen und Glutaminsäure eine maßgebende Rolle.

Ich untersuchte einige Produkte, die als "Soße zum Rinderbraten","Soße zum Braten" und "Klarer Bratensaft" im Handel sind auf ihren Gehalt an freien Aminosäuren. Dabei erhielt ich praktisch identische Chromatogramme für die verschiedenen Proben. Glutaminsäure ist die Aminosäure mit der größten Konzentration. Daneben wurden in unterschiedlichen Mengen Glycin, Alanin, Valin, Prolin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Methionin und Lysin gefunden. Die "Soße zum Rinderbraten" enthält mehr Serin und Threonin als die anderen Produkte. Das Gaschromatogramm, das ich bei der Aminosäureanalyse dieser Probe erhielt, ist in Abbildung 20 wiedergegeben.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 21 die Aminosäurezusammensetzung einer selbst hergestellten Rinderbratensoße.

Die Glutaminsäurekonzentration ist hier im Vergleich zum Glutaminsäuregehalt in den gekauften Soßen deutlich erniedrigt; entsprechend liegen die übrigen Aminosäuren in größerer Menge vor. Insbesondere die Gehalte an Glycin, Alanin und Prolin sind erhöht. Bemerkenswert ist das Auftreten eines Hydroxyprolin-Peaks. Diese Aminosäure wurde in den Soßen des Handels nicht gefunden. Sie kommt im Bindegewebe des Fleisches in ziemlich konstanter Konzentration vor. Beim Bereiten der

Bratensoße wird sie wie die anderen Aminosäuren aus dem Fleisch gelöst.

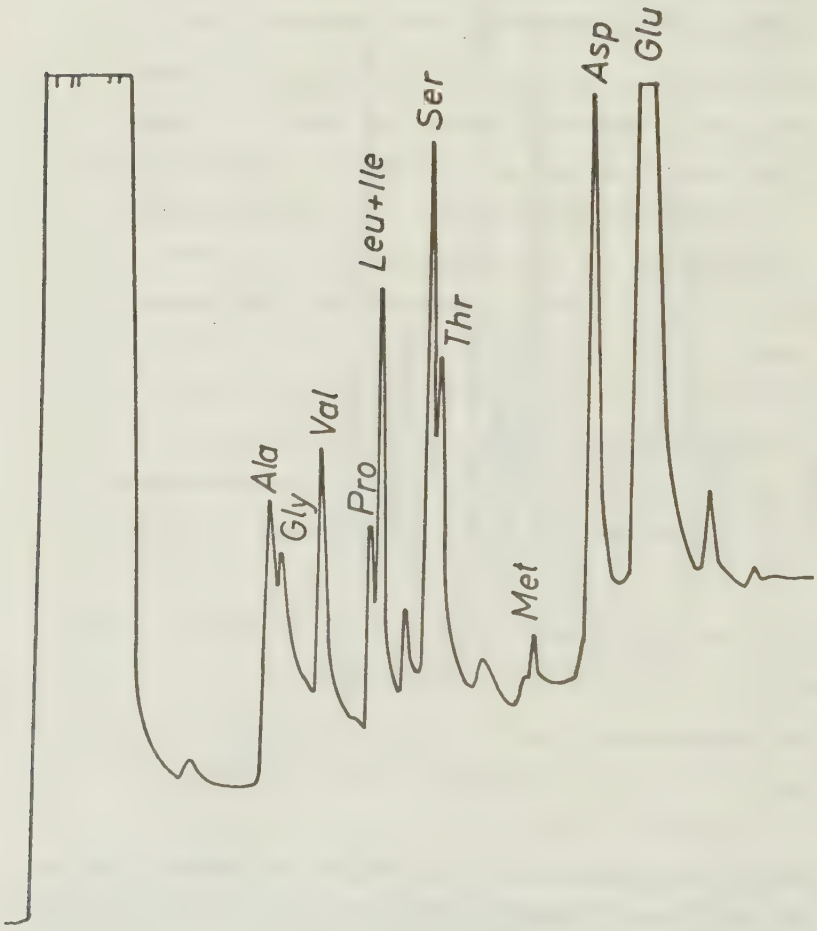


Abb. 20 : GC-Analyse von "Soße zum Rinderbraten", Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

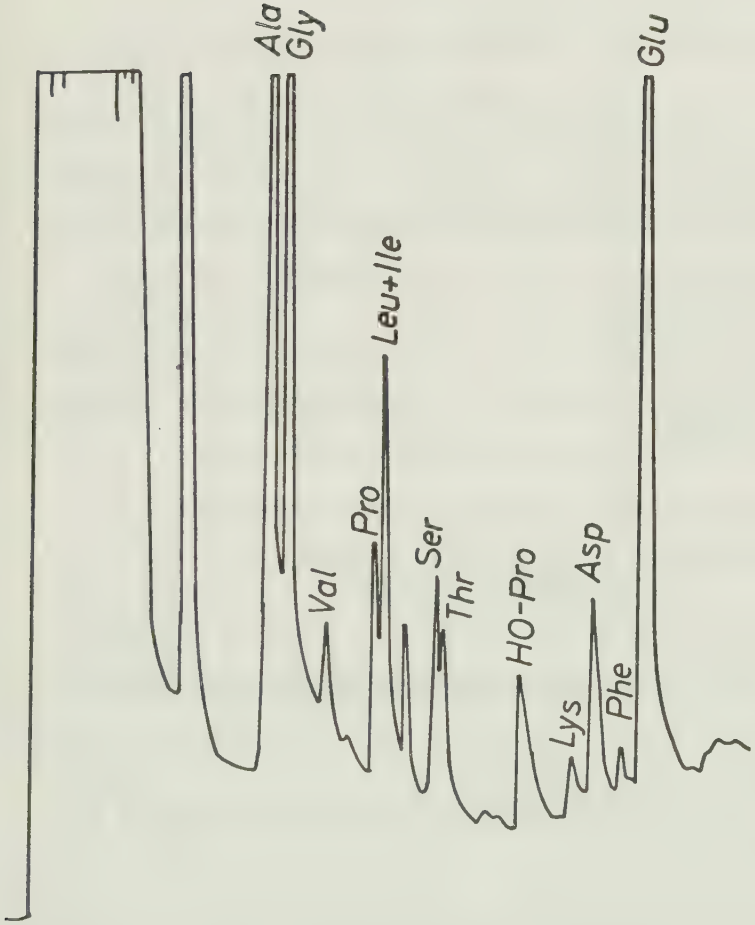


Abb. 21 : GC-Analyse einer selbst hergestellten Rinderbratensoße, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

8. Untersuchung von rohem und gebratenem Fleisch

Fleisch wird meist erst nach entsprechender Zubereitung gegessen. Besonders beliebte Zubereitungsarten sind Braten und Rösten. Hierbei bleibt der Fleischsaft weitgehend erhalten und die entstehenden Röstprodukte verbessern den Geschmack. Allerdings warnen Mediziner neuerdings vor dem Genuß von stark gebratenem Fleisch. Beim Braten entstehende Verbindungen sollen Magenkrankheiten fördern oder hervorrufen. Es ist daher interessant, die chemischen Vorgänge beim Braten von Fleisch zu untersuchen. Um zur Klärung des Verhaltens von Fleischprotein beim Erhitzen beizutragen, führte ich die folgenden Versuche durch.

Eine genau abgewogene Menge Rindergulasch zerkleinerte ich, entfettete die Probe mit Methylenchlorid und hydrolysierte 24 Stunden mit 6 N HCl unter N_2-Atmosphäre. Das neutralisierte Hydrolysat wurde zur Trockene eingeengt. In diesem Rückstand führte ich eine gaschromatographische Aminosäure-Analyse durch. Dazu wurden die Aminosäuren in die N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester übergeführt (Abb. 22).

Die gleiche Menge Rindergulasch schnitt ich in hauchdünne Scheiben. Diese wurden dann in heißem Pflanzenfett stark gebraten. Nach dem Zerkleinern und Entfetten wurde auch diese Probe einer Hydrolyse unterworfen. Das Hydrolysat neutralisierte ich und engte zur Trockene ein. Mit dem Rückstand wurde in gleicher Weise wie beim rohen Fleisch eine gaschromatographische Aminosäurebestimmung durchgeführt (Abb. 23).

Milchs.
Ala
Gly
Val
Pro
Leu+Ile
Ser
Thr
HO-Pro
Lys
Met
Asp
Phe
Glu
I.S.

Abb. 22 :

Abb. 23 :

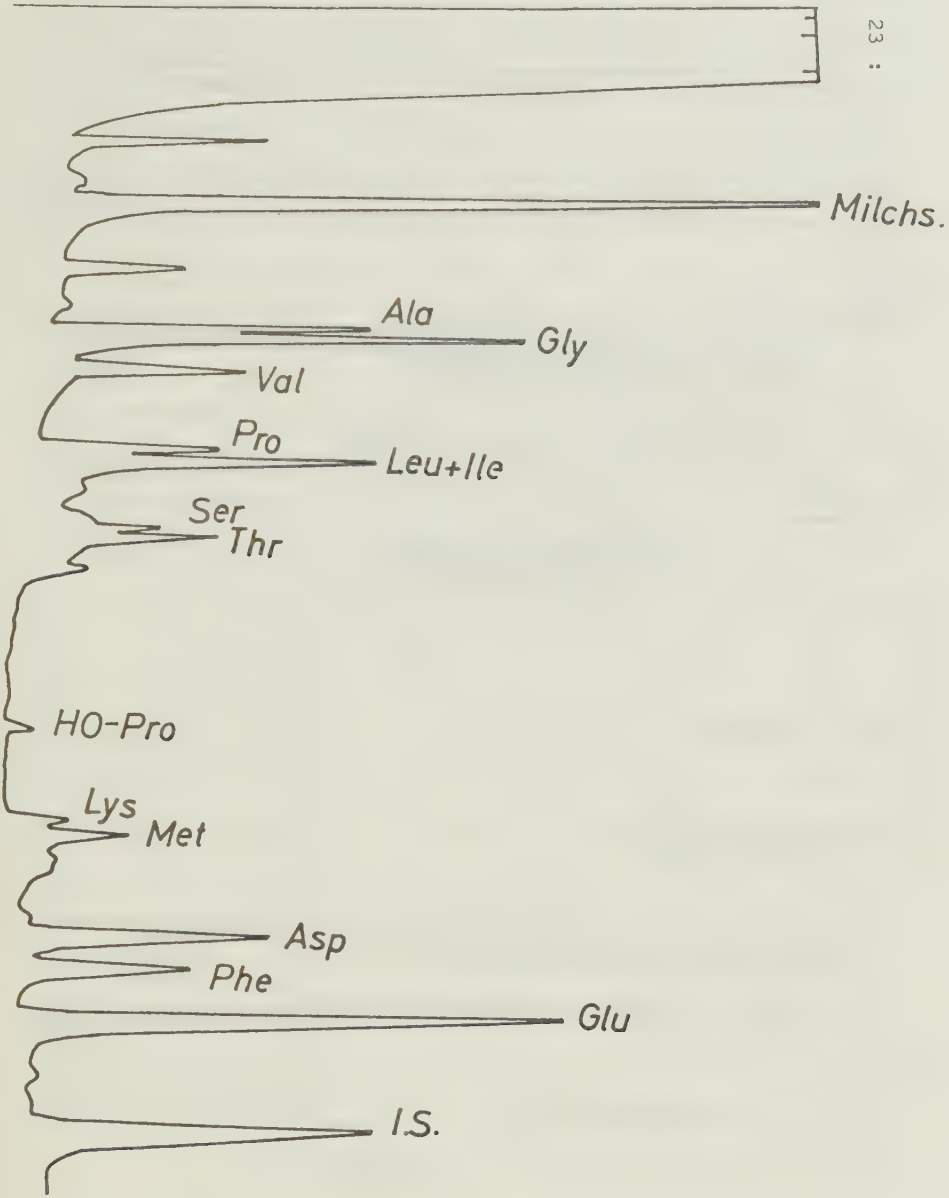

Milchs.
Ala
Gly
Val
Pro
Leu+Ile
Ser
Thr
HO-Pro
Lys
Met
Asp
Phe
Glu
I.S.

Abb. 22 : GC-Analyse von rohem Fleisch, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

Abb. 23 : GC-Analyse von gebratenem Fleisch, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

Bei der Durchführung dieser beiden Aminosäure-Analysen arbeitete ich jeweils mit gleichen Mengen bzw. gleichen Volumina, um aus der Größe der Peaks in den Chromatogrammen auf die Aminosäurekonzentrationen schließen zu können. Zu jeder Probe wog ich eine genaue Menge Palmitinsäurebutylester als inneren Standard.

Ein Vergleich der beiden Gaschromatogramme zeigt, daß ein Teil der Fleischproteine beim Braten zerstört wird. Das Hydrolysat des gebratenen Fleisches weist insgesamt eine geringere Aminosäurekonzentration auf. Während der Glutaminsäure-Peak in Abb. 22, dem Aminosäurechromatogramm des rohen Fleisches, sehr breit ist, reicht er in Abb. 23 kaum über die Hälfte des Chromatogramms. Im gleichen Maß ist der Gehalt der beiden Aminosäuren Glycin und Alanin im gebratenen Fleisch erniedrigt. Auffallend stark ist die Zerstörung von Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Lysin, während die Aminosäuren Methionin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Leucin, Isoleucin und Valin weniger große Verluste auftreten. Vergleicht man

z.B. die Aminosäuren Lysin und Methionin in beiden Proben, so ist im Chromatogramm des rohen Fleischs der Peak für Lysin etwas höher als der für Methionin. Während der Methioningehalt im gebratenen Fleisch nur etwa halb so hoch ist wie im rohen Fleisch, ist Lysin im Aminosäure-Spektrum des gebratenen Fleischs kaum noch erkennbar. Ebenso sind Serin und Threonin in der gebratenen Probe nur noch in geringer Menge nachweisbar. Im Aminosäurechromatogramm von rohem Fleisch reichen die Peaks für diese Aminosäuren etwa bis in die Hälfte des Chromatogramms. Demnach unterliegen die Aminosäuren, die neben der Aminosäurefunktion eine reaktive Seitenkette enthalten, einem besonders starken Abbau.

Die Amino- und die Carboxylgruppe der Aminosäuren liegen im Lebensmittel nicht in freier Form vor, sondern sind im Protein in peptidischer Verknüpfung gebunden. Funktionelle Gruppen wie die ε-Aminogruppe im Lysin, die Hydroxygruppe in Serin, Threonin und Hydroxyprolin liegen im Protein in nichtgebundener Form vor. Bei Einwirkung von hohen Temperaturen wie beim Braten können diese Gruppen untereinander oder mit anderen Lebensmittelbestandteilen wie Kohlenhydraten reagieren. In Folgereaktionen kann auch eine Spaltung der Peptidbindung erfolgen.

9. Untersuchung von Parmesan-Käse

Bei der Käsereifung erfährt Milcheiweiß durch proteolytische Enzyme eine Spaltung zu Peptiden und Aminosäuren. Die Untersuchung von Parmesan-Käse, der in die Gruppe der Lab-Käse einzureihen ist, ergab das in Abbildung 24 dargestellte Aminosäure-Spektrum.

Aus dem Gaschromatogramm ist ersichtlich, daß die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Prolin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure im Parmesan-Käse frei vorliegen. Glutaminsäure dominiert, allerdings weniger stark als in Fleischextrakt, Würze und den daraus hergestellten Produkten.

10. Untersuchung von Krabbenextrakt

Untersuchungen an Krabben sind von besonderem Interesse, da Krabben bei der Lagerung sehr schnell an Geschmackswert verlieren.

Ich analysierte einen Krabbenextrakt, den ich durch zweistündiges Kochen von tiefgefrorenen Krabben in Wasser herstellte, auf seine Aminosäure-Zusammensetzung (Abb. 25).

In hoher Konzentration kommen Alanin und Glycin vor, gefolgt von Glutaminsäure. Die Peaks für Valin, Leucin / Isoleucin, Prolin, Methionin und Asparaginsäure sind im abgebildeten Aminosäure-Chromatogramm wesentlich kleiner als die für Alanin, Glycin und Glutaminsäure.

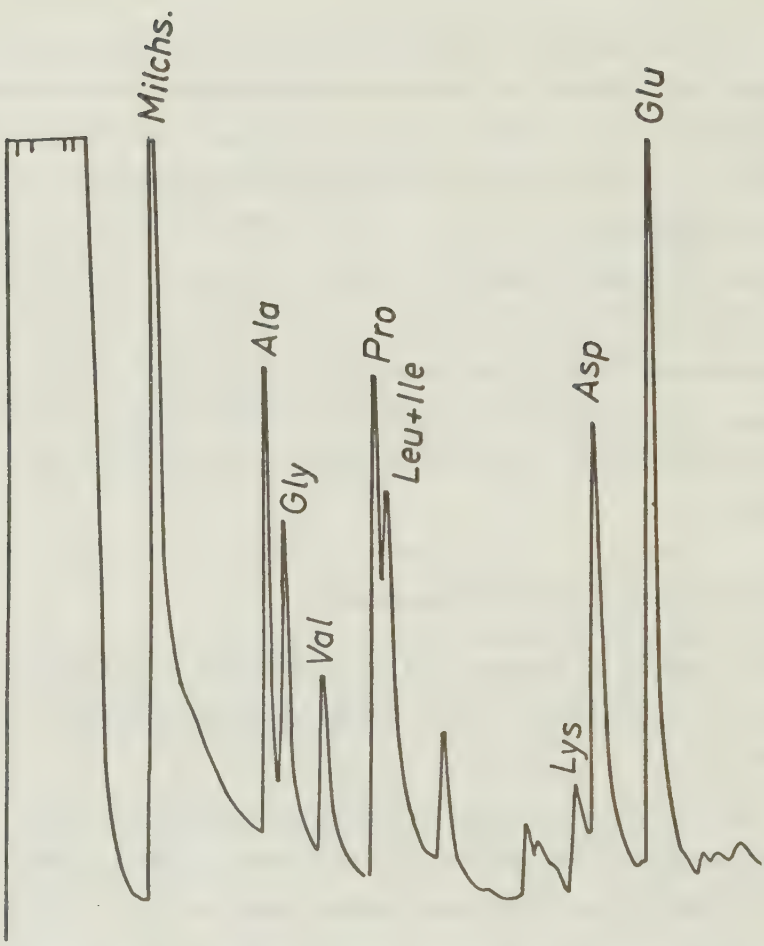


Abb. 24 : GC-Analyse von Parmesan-Käse, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

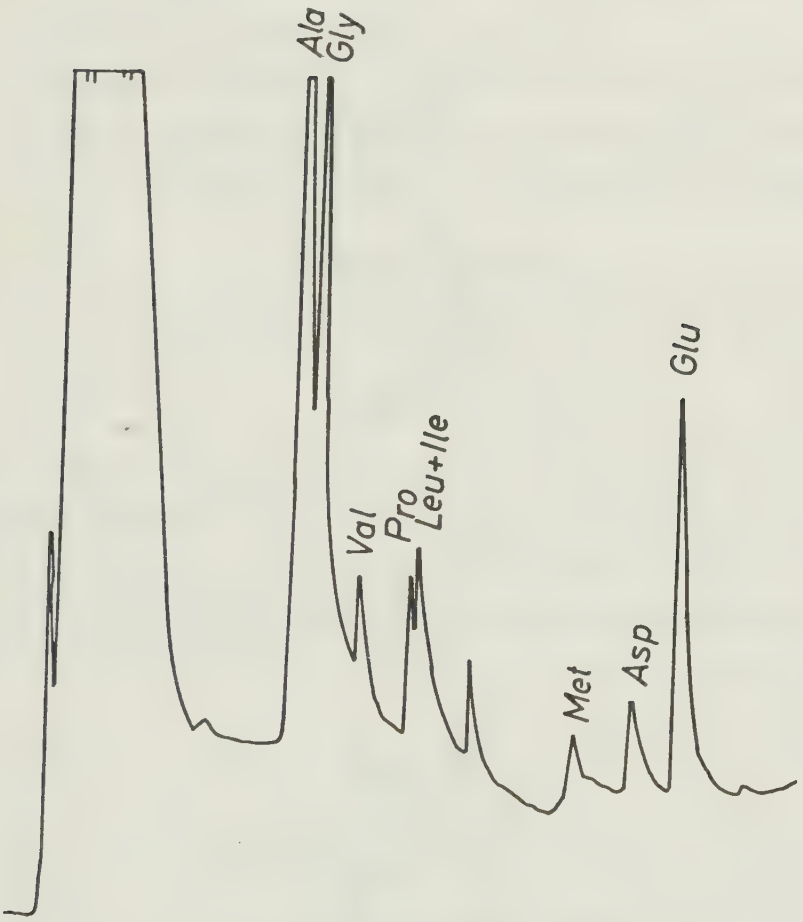
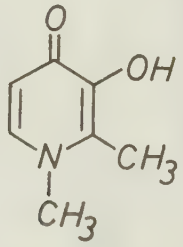


Abb. 25 : GC-Analyse von Krabbenextrakt, Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester; Säule: 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8". Anfangstemperatur 60°C, Temperaturrate 4°/min

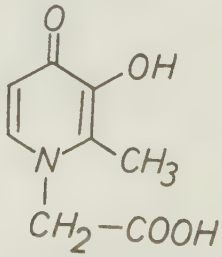
VIII. Umsetzung von Isomaltol mit Lysin

Th. Severin und A. Loidl fanden, daß bei Reaktion von Maltose und Lactose mit Methylammoniumacetat 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-pyridon-(4) (49) entsteht. Auch Maltol und Isomaltol lassen sich mit Methylammoniumacetat zu dem Pyridon 49 umsetzen [58].



49

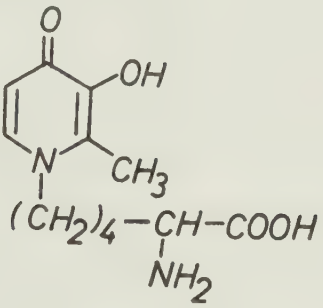
Analog reagiert Isomaltol mit Glycin zum 1-Carboxymethyl-3-hydroxy-2-methyl-pyridon-(4) (50) [59].



50

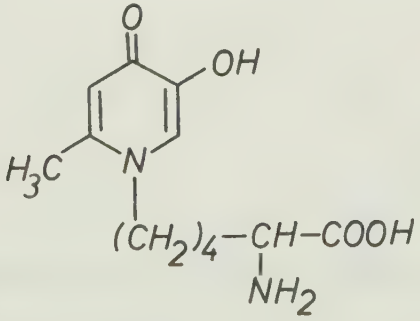
Auf Grund dieser Ergebnisse konnte man erwarten, daß sich bei der Umsetzung von Lactose, Maltose oder Isomaltol mit Lysin das ε-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-

Lysin (51) bilden würde.



51

Die Isolierung dieser Verbindung war von Interesse, da in der Lebensmittelanalytik bereits ein verwandtes Pyridon Beachtung gefunden hat. Aus Säurehydrolysaten von Lebensmitteln konnte ε-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-Lysin (Pyridosin) (52) isoliert werden [60].

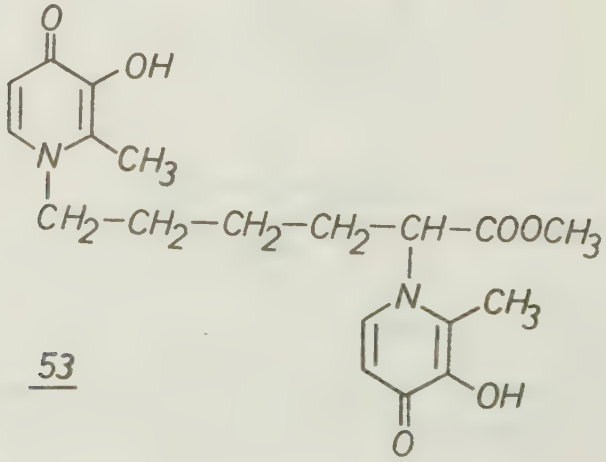


52

Die analytische Bedeutung dieser Substanz liegt darin, daß sich über sie eine Hitzebehandlung von Lebensmitteln nachweisen

läßt. Erhöhter Gehalt an Pyridosin zeigt einen verminderten Anteil an verfügbarem Lysin in einem Nahrungsmittel an und ist so als Indiz für die Wertminderung eines Lebensmittels infolge von Hitzeeinwirkung zu betrachten.

Ich setzte Isomaltol mit Lysin um. Die Isolierung von Verbindung 51 gestaltete sich wegen ihrer polaren Struktur schwierig. Ich unterwarf die Substanz im Reaktionsgemisch weiteren Umsetzungen, um sie lipophiler und flüchtiger zu machen. Es bot sich zunächst die Veresterung der Säuregruppe an. Nach Umsetzung mit methanolischer HCl konnte aus der wässrigen Lösung der Reaktionsprodukte eine Substanz extrahiert werden, die mit $FeCl_3$-Lösung eine tiefviolette Färbung gibt; dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines Hydroxypyridons. Nach Reinigung mit präparativer Schichtchromatographie fällt die Verbindung kristallin an. Eine eingehende Analyse ergab, daß es sich um α,ε-N-Bis-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-Lysinmethylester (53) handelt.



53

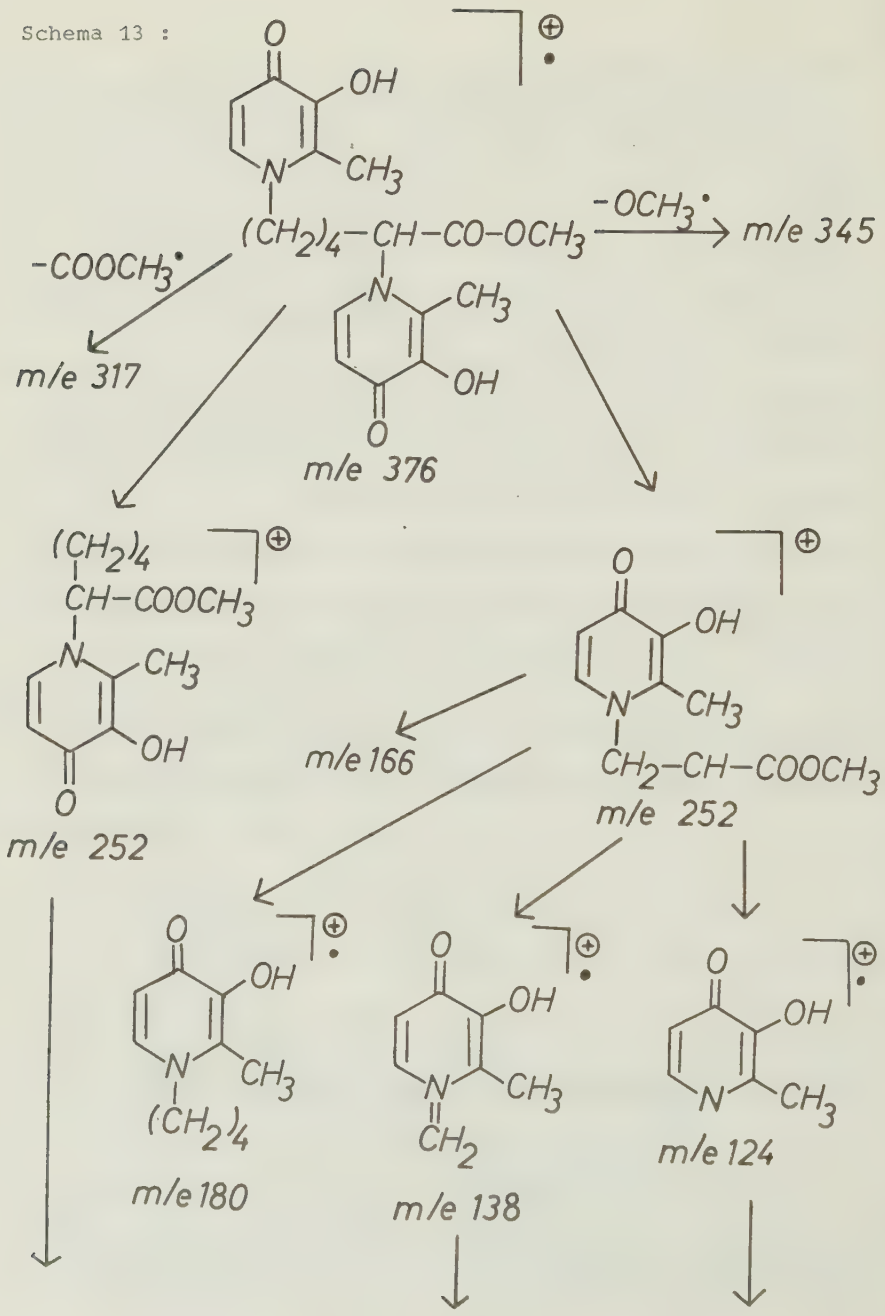
Demnach werden sowohl die α-Aminogruppe als auch die ε-Aminogruppe in ein Pyridongerüst eingebaut, obwohl sterische Faktoren für eine bevorzugte Reaktion der ε-Aminogruppe sprechen.

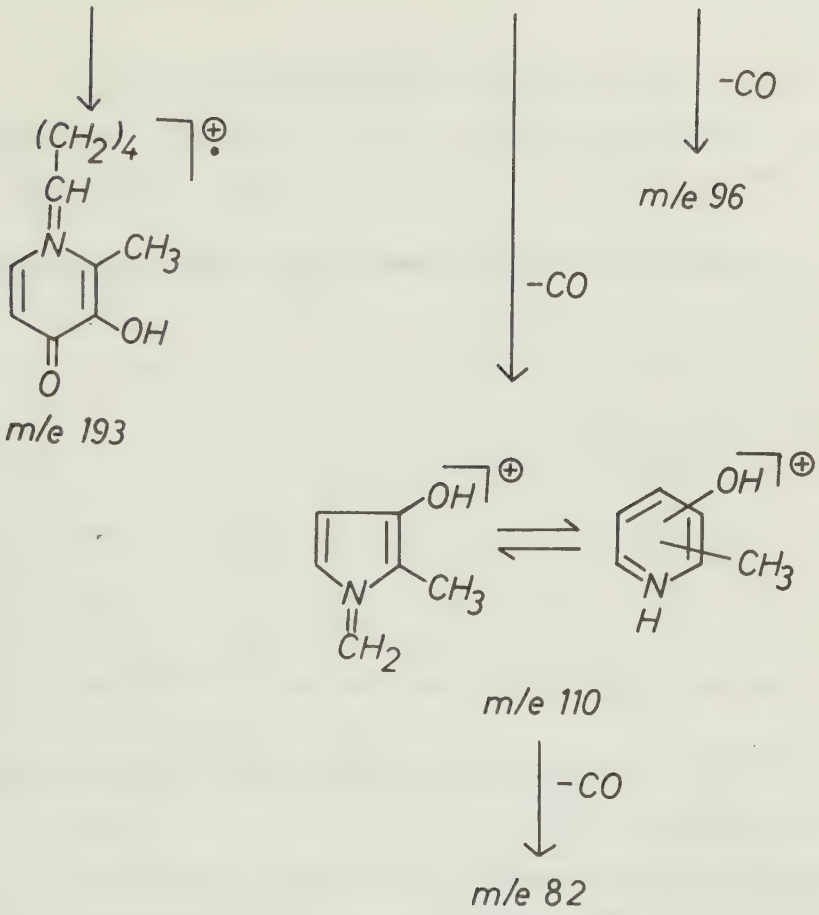
In weiteren Versuchen wurde das Molverhältnis zugunsten von Lysin erhöht; die Ausbeute an 53 wurde dadurch nicht spürbar erniedrigt. Sie liegt bei 5%.

Die Struktur von 53 ergibt sich aus der Elementaranalyse und den Spektren. Aus der Elementaranalyse und dem Massenspektrum berechnet man die Summenformel $C_{19}H_{24}N_2O_6$.

Der Molekülpeak des Massenspektrums zeigt das Molekulargewicht 376 an. Wichtige Strukturmerkmale erkennt man durch Interpretation des massenspektrometrischen Zerfalls (Schema 13). Deutlich ist die Abspaltung eines Pyridonringes zu erkennen, woraus Bruchstücke der Masseneinheit 252 mit hoher Intensität entstehen. Da jedes Molekül 53 zwei Pyridonringe enthält, ist die Wahrscheinlichkeit ziemlich groß, daß bei Elektronenbeschuß ein Pyridonring, der selbst relativ stabil ist, abgetrennt wird. Diese Primärbruchstücke m/e 252 unterscheiden sich in der Struktur, je nachdem ob der Pyridonring am 2-C oder am 6-C des Hexansäureesters abgetrennt wurde. Die Fragmentierung am 2-C wird durch die Ausbildung eines stabilen tertiären Carboniumions gegenüber einem sekundären Carboniumion bei der Spaltung am 6-C begünstigt. Dafür spricht auch die Struktur der Spaltstücke mit kleineren Masseneinheiten. Die folgenden Fragmentierungswege führen zunächst zum Verlust der Estergruppe und dann zur Bildung von Signalgruppen in

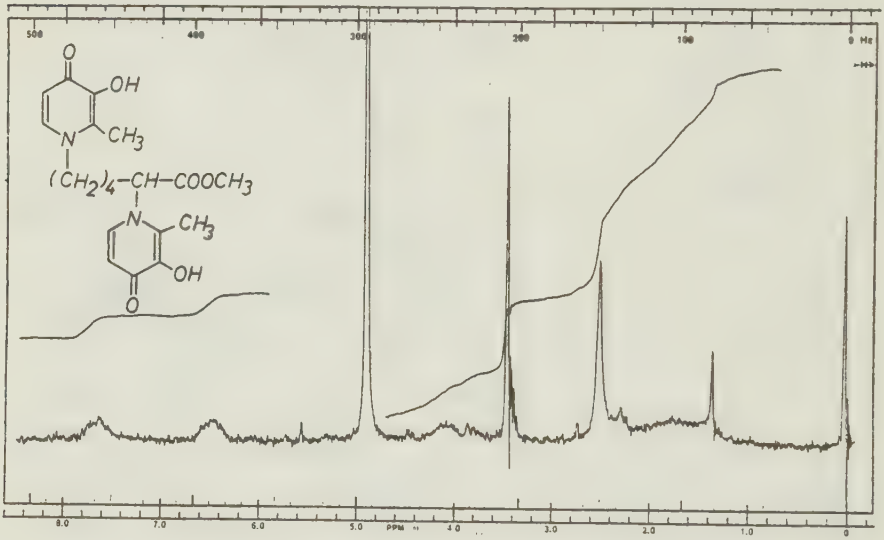
Schema 13 :


-OCH3•
m/e 345
-COOCH3•
m/e 317
m/e 376
m/e 166
m/e 252
m/e 252
m/e 180
m/e 138
m/e 124



regelmäßigen Abständen von 14 Masseneinheiten. Letztere sind typisch für Alkane. Das Ion m/e 138 ist aus massenspektrometrischen Untersuchungen verschiedener Pyridone bekannt [61]. Es eliminiert leicht CO, wobei m/e 110 resultiert, dessen relativ hohe Intensität durch die Bildung eines sehr stabilen Pyridinrings aus dem zuerst entstandenen Pyrollring zu erklären ist. Nochmaliger Verlust von CO führt zu m/e 82, dessen Bildung auch aus m/e 138 durch eine Retro-Diels-Alder-

Reaktion vorstellbar wäre. Vom Molekülpeak aus wird noch die für Carbonsäureester typische Spaltung beiderseits der Carbonylgruppe beobachtet. So kommen m/e 345 und m/e 317 zustande.



NMR-Spektrum von 53

Im NMR-Spektrum findet man für die Methylestergruppe ein Singulett bei δ = 3,50 ppm, für die Methylgruppe der Pyridonringe ein Singulett bei δ = 2,40 ppm. Die ringständigen Protonen geben je ein Multiplett bei δ = 6,40 ppm und δ = 7,60 ppm. Für die Protonen der Alkankette treten Multipletts im Bereich von δ = 1,30- 4,00ppm auf.

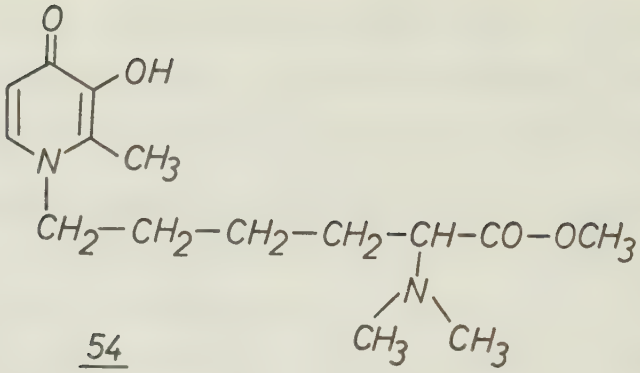
Das IR-Spektrum zeigt starke Banden bei 1740, 1630, 1570, 1520 und 1240 cm^{-1}. Bei diesen Wellenlängen absorbieren auch andere Verbindungen dieses Strukturtyps [62]. Die Bande bei 1740 cm^{-1} ist der Estercarbonylgruppe zuzuordnen, die bei

1630 cm^{-1} der Carbonylgruppe des Pyridonrings.

53 gibt ein für derartige Pyridone typisches UV-Spektrum. Die Absorptionsmaxima liegen bei 218 nm und 283 nm. Im Vergleich zum 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-pyridon-(4) (49) [63] sind die Maxima nur geringfügig zum längerwelligen Bereich verschoben.

Beim Besprühen mit $FeCl_3$-Lösung färbt sich 53 tiefviolett. Dieses Verhalten stimmt mit den Beobachtungen von Heyns und Vogelsang [64] überein, die andere Hydroxypyrone und -pyridone untersuchten. Danach geben γ-Pyrone mit einer Hydroxylgruppe in 3-Stellung mit $FeCl_3$ eine tiefrote Färbung, 3-Hydroxypyridone-(4) dagegen eine tiefviolette. Wird die Oxygruppe verätherт oder acyliert, so bleibt bei γ-Pyronen die Färbung aus, γ-Pyridone geben dann eine orange Färbung. Die Art der Substituenten in 1- und 2-Stellung ist auf die Farbbildung ohne Einfluß.

Die wässrige Phase, aus der ich 53 mit Methylenchlorid extrahiert hatte, ließ ich mit Formaldehyd / Natriumcyanoborhydrid reagieren. Die Reaktionslösung wurde mit Methylenchlorid ausgezogen und die eingeengte organische Phase auf Kieselgelplatten chromatographiert. Eine Zone gibt mit $FeCl_3$-Lösung eine violette Färbung. Diese Zone liefert nach dem Eluieren vom Kieselgel im Hochvakuum sublimierbare farblose Kristalle. Sie konnten als ε-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-α-N,N-dimethyl-Lysinmethylester (54) identifiziert werden.



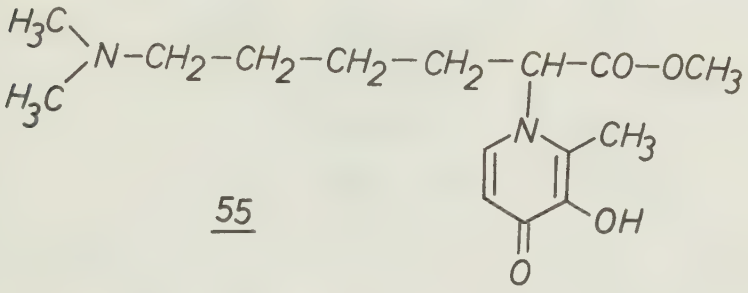
54

Diese Verbindung stellt ein Alkylderivat des bei der Umsetzung von Lysin mit Isomaltol erwarteten Pyridons 51 dar.

Aus der Elementaranalyse und dem Massenspektrum ergibt sich für 54 die Summenformel $C_{15}H_{24}N_2O_4$.

Beim massenspektrometrischen Zerfall von 54 führt die Primärfragmentierung unter Verlust der Ester- bzw. der Dimethylaminogruppe zu Bruchstücken der Masseneinheiten 237 bzw. 252, aus denen sich dann als wichtigstes Ion m/e 180 neben den Bruchstücken m/e 166, m/e 152, m/e 138 und m/e 124 bildet. Diese Ionen treten auch im Massenspektrum von 53 auf ; m/e 138 und m/e 124 geben im Massenspektrum für Pyridone typische Bruchstücke, die bereits in Schema 13 dargestellt sind. Fragment m/e 180 ist für die Strukturermittlung von 54 bedeutend. Sein Auftreten bestätigt, daß bei der Reaktion von Isomaltol mit Lysin die ε-Aminogruppe des Lysins in den Pyridonring eingebaut wird. Daneben wäre auch der Einbau der α-Aminogruppe möglich, doch sollten sterische Faktoren die Umsetzung der ε-Aminogruppe begünstigen.

Wäre die α-Aminogruppe in Reaktion getreten, so hätte ich folgende Verbindung (55) isolieren müssen :

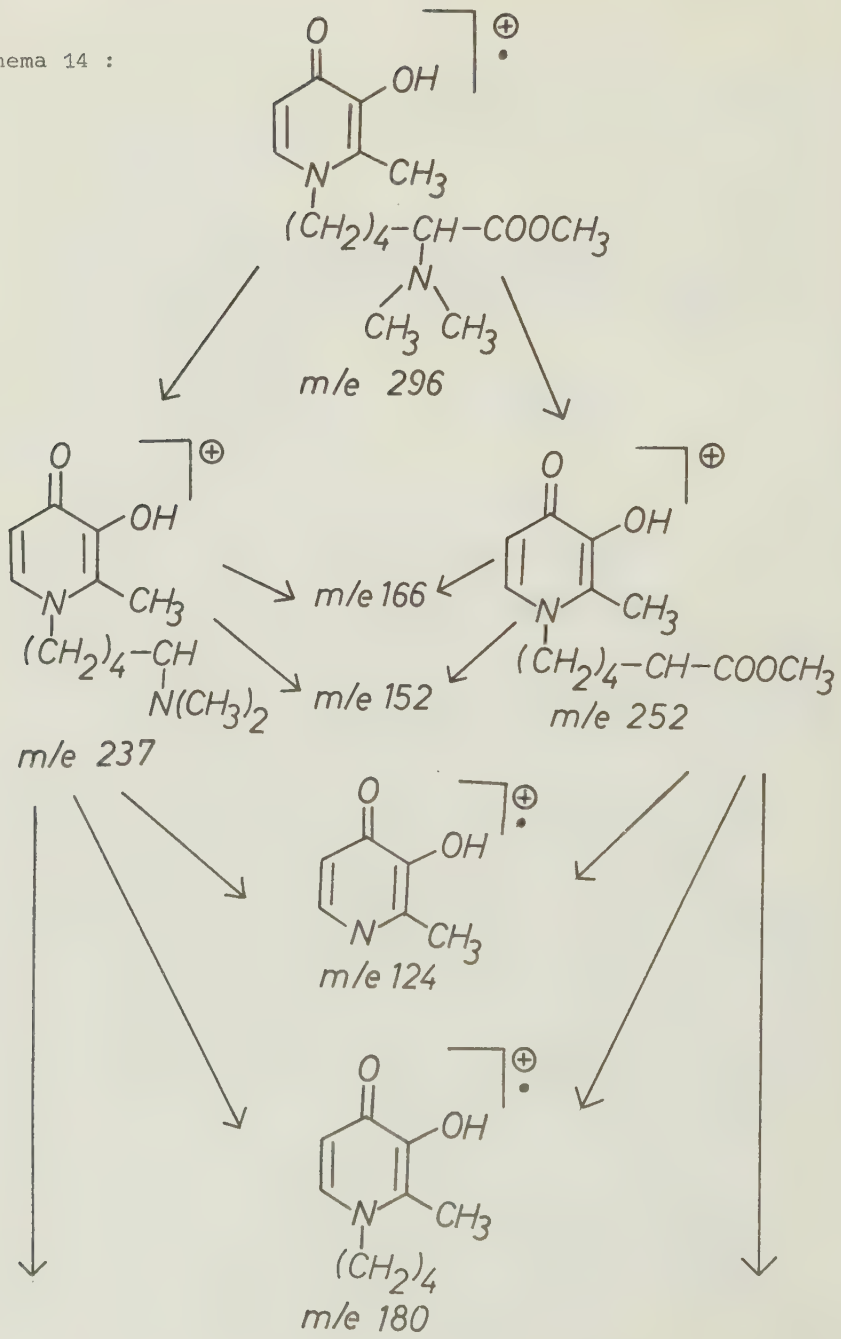


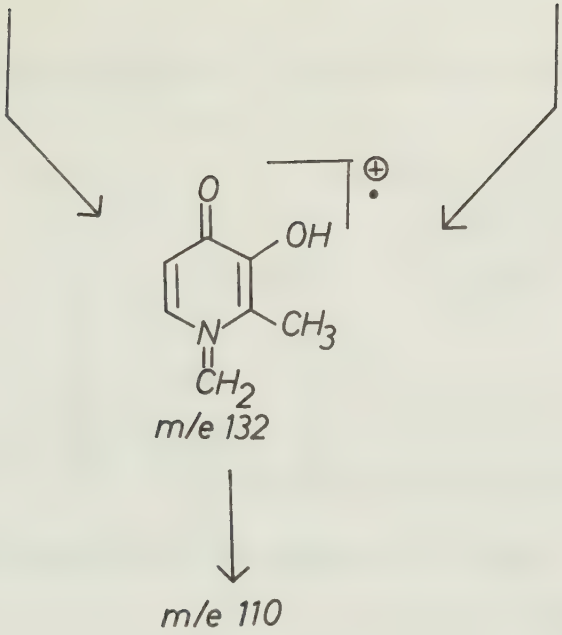
55

Das Massenspektrum von α-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-N,N-dimethyl-Lysinmethylester (55) hätte ein anderes Signalmuster geliefert als das von 54. Die Abspaltung der Dimethylamino- und der Estergruppe wäre sicher auch bei 55 bevorzugt. Der Verlust dieser beiden Gruppen müßte zu m/e 193 führen, während bei 54 neben diesen beiden Bruchstücken das der Carboxymethylgruppe benachbarte C-Atom mit abgespalten wird und m/e 180 entsteht. Diese Fragmentierung ist in 55 nicht möglich, da dort das der Carboxymethylgruppe benachbarte C-Atom noch mit dem Pyridonring verbunden ist. Das Ion m/e 193 konnte im Massenspektrum von 54 nicht gefunden werden.

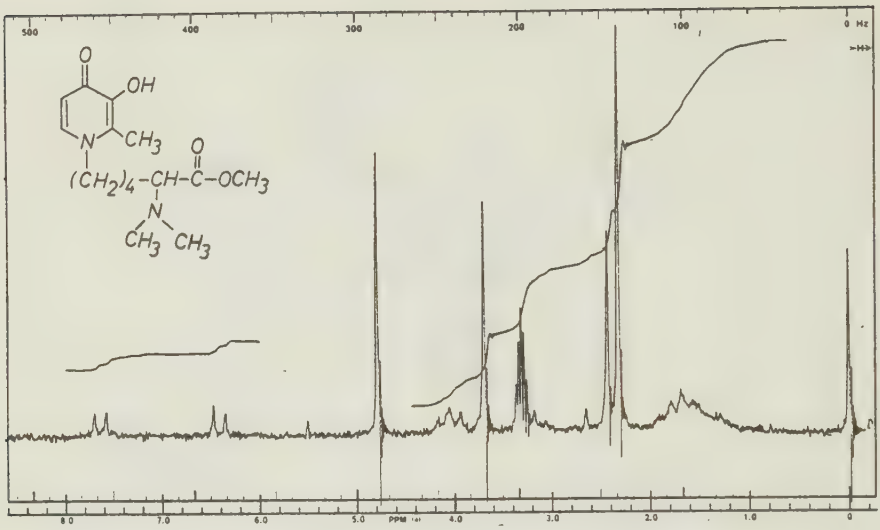
Aus dem folgenden Schema sind die verschiedenen Abbauwege von 54 im Massenspektrometer ersichtlich.

Schema 14 :





Das NMR-Spektrum von 54 enthält für die Methylgruppen je ein Singulett bei δ = 3,75 ppm (Estergruppe), bei δ = 2,35 ppm (Dimethylaminogruppe) und bei δ = 2,40 ppm (Methylgruppe am Pyridonring). Im Bereich von δ = 1,20-4,00 ppm erscheinen die Protonen des Lysinrestes als Multiplett. Die ringständigen Protonen ergeben je ein Duplett bei δ = 6,40 ppm und δ = 7,60 ppm. Die Kopplungskonstante dieser Protonen beträgt 7,2 Hz. Dieser Wert nimmt eine Mittelstellung zwischen den bei γ-Pyronen und 4-Thiopyronen auftretenden Kopplungskonstanten ein und ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines Sechsringes, da benachbarte Protonen in heterocyclischen Fünfringen eine wesentlich kleinere Kopplungskonstante aufweisen.



NMR-Spektrum von 54

Die Lage des Dimethylaminosignals bei δ = 2,35 ist neben dem Massenspektrum ein Hinweis für den Einbau des ε-Aminostickstoffs von Lysin im Pyridonring. Durch die Carbonylgruppe in α-Stellung zur Dimethylaminogruppe in 54 ist der δ-Wert für das Dimethylsignal etwas erhöht im Vergleich zu einem Dimethylsignal eines reinen Alkylamins. N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-butandiamin gibt z.B. ein Singulett bei δ = 2,20 ppm [65]. Ein Signal bei δ = 2,20 ppm wäre entstanden, wenn die ε-Aminogruppe des Lysins bei Umsetzung von Isomaltol mit Lysin nicht reagiert hätte und später dann bei Derivatisierung des Reaktionsproduktes methyliert worden wäre.

Im IR-Spektrum erkennt man deutlich die für derartige Pyridone typischen Banden bei 1630, 1570, 1520 und 1240 cm^{-1} [66]. Die Absorption bei 1630 cm^{-1} ist die Schwingung der Pyridon-

carbonylgruppe zuzuordnen. Die starke Bande bei 1730 cm^{-1} rührt von der Estercarbonylgruppe her.

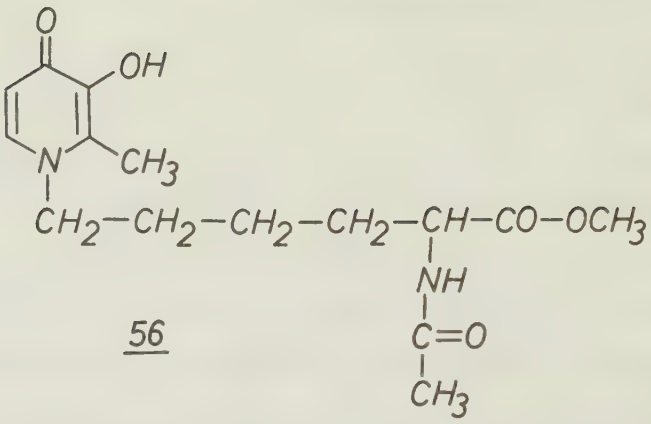
Das UV-Spektrum von 54 ist mit dem der Verbindung 53 identisch.

Zur Bestätigung der Struktur von 54 wurden weitere Reaktionen durchgeführt.

Ich setzte Isomaltol mit α-N-Acetyllysin unter den gleichen Bedingungen wie vorher Isomaltol mit Lysin um. An die eigentliche Reaktion schloß ich auch hier eine Veresterung mit methanolischer HCl an. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Wasser gelöst, neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgezogen. Ich unterwarf den eingeengten organischen Extrakt einer DC-Analyse auf Kieselgel. Mit $FeCl_3$-Reagenz gibt eine Zone die für 3-Hydroxypyridone charakteristische violette Farbreaktion. Diese Zone wird vom Kieselgel eluiert. Man erhält ein hellgelbes Öl, das Hochvakuum destillierbar ist.

Auf Grund der Erkenntnisse aus den vorangegangenen Versuchen sollte dieses Öl α-N-Acetyl-ε-N-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-Lysinmethylester (56) sein.

Wie das Massenspektrum zeigt, ist Verbindung 56 tatsächlich entstanden.

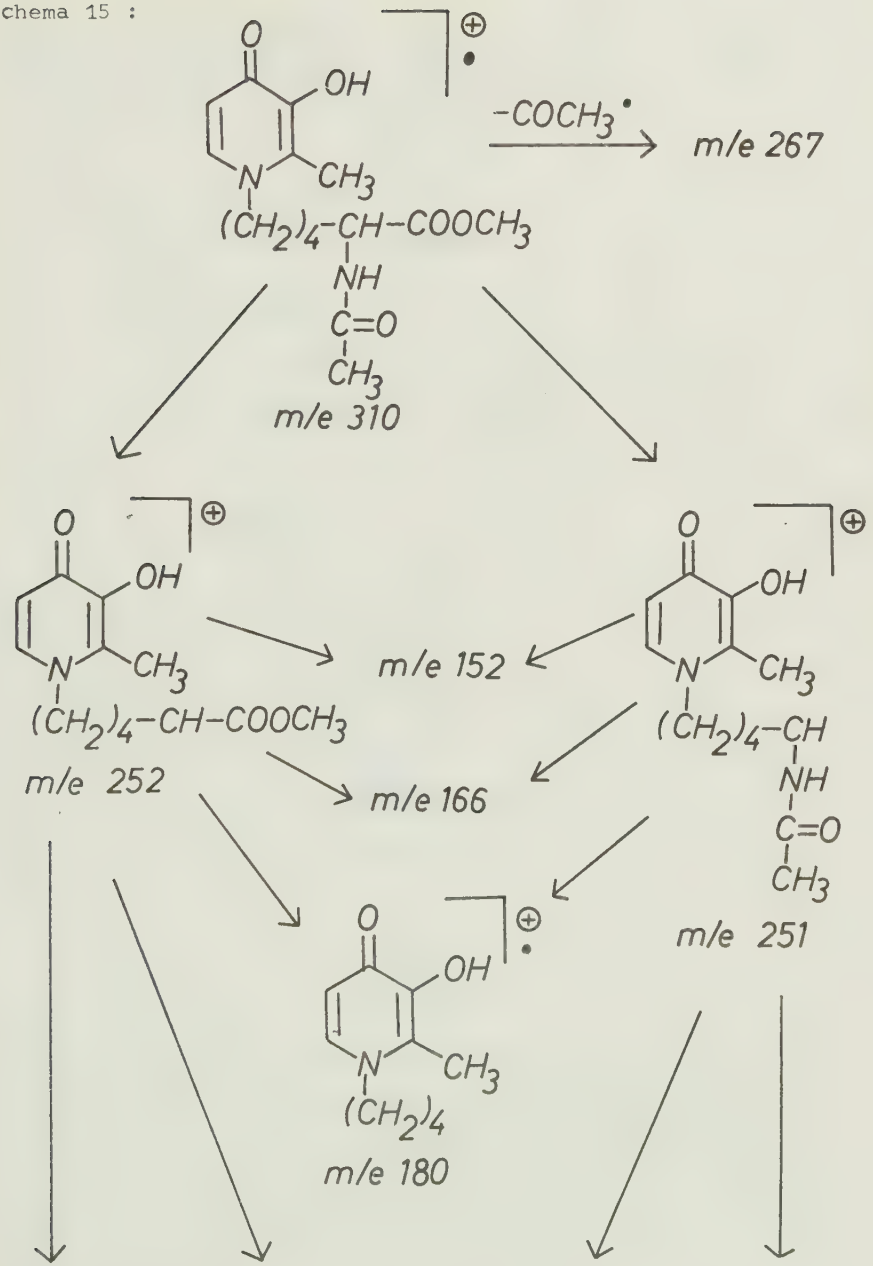


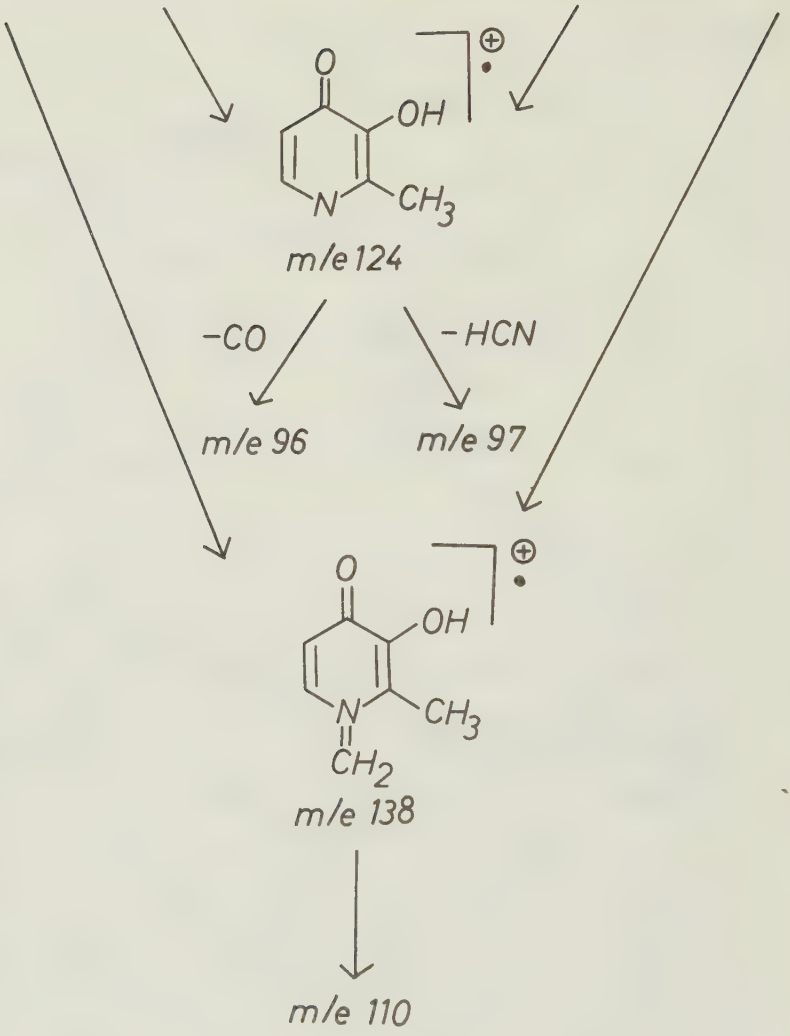
56

Der Molekülpeak M^+ 310 bestätigt für 56 die Zusammensetzung $C_{15}H_{22}N_2O_5$. Durch Abspaltung der Methylestergruppe, des Acetylrestes bzw. der $-NH-CO-CH_3$-Gruppierung entstehen die Bruchstücke m/e 251, m/e 267 und m/e 252. Aus jedem dieser Fragmente können durch weiteren Abbau die Ionen m/e 180, m/e 166, m/e 152, m/e 138 und m/e 124 gebildet werden. Sie sind aus den Massenspektren von 53 und 54 bekannt. Ihr weiterer Abbau wurde bereits dort diskutiert. Das Auftreten dieser Bruchstücke bei den Verbindungen 53, 54 und 56 läßt erkennen, daß diese Substanzen ein gleiches Strukturelement besitzen, nämlich einen Pyridonring mit einer unverzweigten C_4-Alkankette in 1-Stellung.

Bei der Umsetzung von α-N-Acetyllysin mit Isomaltol muß die ε-Aminogruppe des Lysins in Reaktion treten, da die α-Aminogruppe durch einen Acetylrest blockiert ist. Es resultiert Verbindung 56, deren Massenspektrum (Schema 15) in Bezug auf

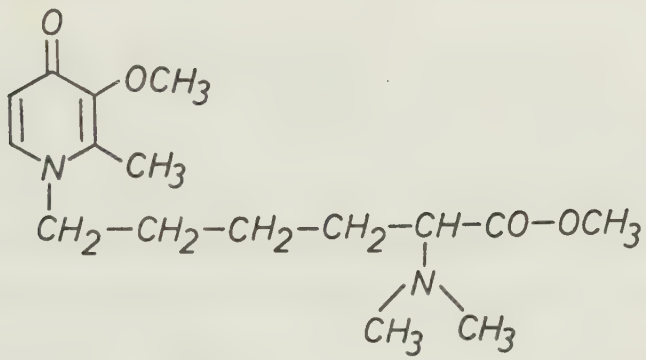
Schema 15 :





das Ion m/e 180 identisch ist mit denen von 53 und 54. Also sind 53 und 54 ebenfalls durch Einbau der ϵ-Aminogruppe des Lysins in den Pyridonring entstanden.

Aus 54 wird durch Umsetzung mit Diazomethan der O-Methyl-äther 57 erhalten.



57

Die Elementaranalyse und der Molekülpeak M^+ 310 ergeben die Zusammensetzung $C_{16}H_{26}N_2O_4$ für 57.

Das NMR-Spektrum zeigt im Vergleich zu dem von 54 ein zusätzliches Singulett bei δ = 3,90 ppm für die O-Methylgruppe.

Mit $FeCl_3$-Lösung gibt der O-Methyläther die für verätherte 3-Hydroxypyridone typische orange Färbung.

IX. Trennung von Aminosäuren als 2,4-Dinitrophenylderivate mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

In den letzten 20 Jahren erlebte die von Tswett entwickelte Säulenchromatographie eine neue Blüte in Form der sogenannten Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Ein Elutionsmittel wird mit hohen Drucken auf die Trennsäule gebracht. Am Säulenende wird dann das Eluat durch einen Detektor kontinuierlich untersucht. Der Vorteil der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie gegenüber den herkömmlichen flüssig-chromatographischen Verfahren liegt in der kürzeren Analysenzeit, der einfacheren Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Stoffkomponenten.

Komplexe technische Probleme wie die Entwicklung leistungsfähiger Pumpen, druckstabiler Trennsäulen sowie empfindlicher Detektoren verzögerten den Vormarsch dieses Analysenverfahrens.

Die Pumpen sollen einen gleichmäßig-konstanten Fluß der mobilen Phase liefern, was besonders bei der sog. "Gradientenelution" Schwierigkeiten macht. Bei der Gradientenelution wird die Zusammensetzung des Elutionsmittels kontinuierlich geändert, so daß die Komponenten eines Gemisches infolge ihrer Polaritätsunterschiede nacheinander von der Säule eluiert werden. Da sich mit dem Wechsel der mobilen Phase meist auch die Viskosität ändert, wird ein gleichbleibender Eingangsdruck stets eine unterschiedliche Fließgeschwindigkeit mit sich bringen. In neueren Geräten konnte eine Konstanz der Durchflußgeschwindigkeit erreicht werden, indem am Ende der Trenn-

säule ständig die Austrittsgeschwindigkeit der mobilen Phase kontrolliert wird, um dann in Form einer Rückkopplung den jeweils benötigten Eingangsdruck einzustellen.

Zur Detektion der Substanzen werden meist folgende physikalischen Eigenschaften ausgenutzt :
Lichtabsorption, Brechungsindex und elektrische Leitfähigkeit.

Mit dem Leitfähigkeitsdetektor können aufgrund des Meßprinzips nur Ionen nachgewiesen werden, während das Refraktometer universeller anwendbar ist. Es zeigt Stoffe an, deren Brechungsindex von dem des Eluenten verschieden ist.

Wegen ihrer relativ geringen Anfälligkeit gegenüber Schwankungen der Temperatur und der Strömungsgeschwindigkeit werden UV-Detektoren häufig benutzt. Die meisten dieser Geräte arbeiten mit nur einer Wellenlänge. Es können nur solche Moleküle nachgewiesen werden, die im Gebiet der Wellenlänge des Detektors absorbieren. Wegen der großen Empfindlichkeit muß nicht unbedingt am Absorptionsmaximum gemessen werden. Mit einem Detektor der Wellenlänge 254 nm können alle Verbindungen, die einen aromatischen Ring enthalten, bestimmt werden. Von Nachteil bei Messung der UV-Absorption sind die oft sehr unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Verbindungen. Das bedeutet, daß gleiche molare Stoffmengen unterschiedliche Peakflächen im Chromatogramm liefern.

Die HPLC unterscheidet mehrere Techniken zur Auftrennung von Stoffgemischen :

die Flüssig-Fest-Chromatographie (Adsorption)

die Flüssig-Flüssig-Chromatographie

die Reversed-Phase-Chromatographie

die Ionenaustauscher-Chromatographie

die Gelpermeations-Chromatographie

Die Adsorption, die Ionenaustauscher-Chromatographie und die Gelpermeations-Chromatographie sind von der herkömmlichen Säulenchromatographie her hinreichend bekannt, während die Flüssig-Flüssig-Chromatographie und insbesondere die Reversed-Phase-Chromatographie erst in neuerer Zeit Anwendung gefunden haben.

Bei der Flüssig-Flüssig-Chromatographie besteht die stationäre Phase aus einer Flüssigkeit, die als Film auf einem Trägermaterial fixiert ist und mit der ebenfalls flüssigen mobilen Phase nicht mischbar ist. Die Substanzen eines Gemisches werden aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften zwischen den beiden Phasen verteilt. Die in dem strömenden Eluenten besser löslichen Komponenten wandern schneller und erscheinen am Säulenende eher.

In der Reversed-Phase-Chromatographie werden an der Oberfläche eines festen Sorbens, das z.B. als gleichmäßige Silikagelschicht auf eine Glaskugel aufgebracht wurde, unpolare Gruppen angebracht. An dieser hydrophoben Oberfläche können unpolare Substanzen, deren Retention bei Verwendung unpolarer Elutionsmittel an oxidischen Sorbentien zu gering ist, je nach Länge ihrer Kohlenstoffkette retardiert werden. Als mobile Phase dient dabei ein polarer Eluent. Reversed-Phase-Systeme werden

auch dort angewandt, wo Stoffe getrennt werden sollen, die nur in sehr polaren Lösungsmitteln löslich sind und daraus an den üblichen polaren Sorbentien nicht zurückgehalten werden.

In der Praxis ist die Trennung zwischen diesen Techniken nicht sehr streng, meist finden sich Übergänge zwischen Adsorptions- und Verteilungs-Chromatographie bzw. zwischen Ionenaustauscher und Gel-Permeations-Chromatographie.

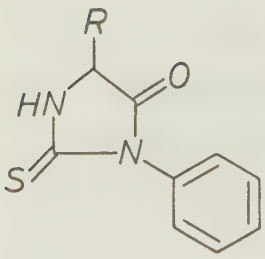
Die Wahl des Sorbens richtet sich nach der angewandten Technik. Kieselgel hat sich als Basismaterial für sehr vorteilhaft erwiesen. Es kann in Form kleiner Partikel eingesetzt werden oder aber als dünne Außenschicht auf ein festes Partikel (z.B. aus Glas) aufgezogen werden. Nach chemischer Modifikation eignet sich Kieselgel praktisch zu allen genannten Chromatographiemethoden. Zur Ionenaustauscher-Chromatographie z.B. können über Si-C-Bindungen saure oder basische Funktionen eingeführt werden. Für die Flüssig-Flüssig-Chromatographie werden Flüssigkeiten unterschiedlicher chemischer Natur als eigentliche stationäre Phase aufgebracht. Lediglich für die Gel-Permeations-Chromatographie werden noch andere Säulenmaterialien, z.B. Dextran-Gele bevorzugt.

Die Auftrennung von Aminosäuregemischen auf flüssig-chromatographischem Weg mit Ionenaustauschern ist seit langem eine Standardmethode. Nach der Weiterentwicklung der Säulenchromatographie zur Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie liegt es nun nahe, diese auch zur Aminosäureanalyse anzuwenden.

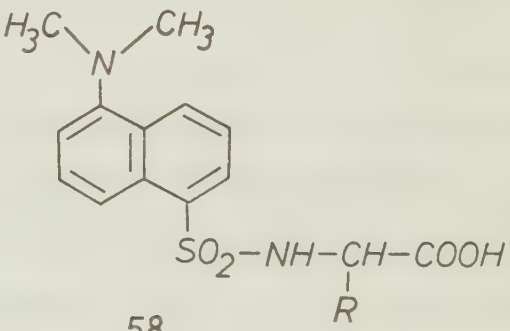
Durch den Einsatz von Ionenaustauschern, die an die Erfordernisse der HPLC angepaßt sind, gelingt es, die Analysen-

zeiten der klassischen Aminosäureanalyse durch Ionenaustauscher-Chromatographie wesentlich zu verkürzen [67]. Benutzt man zur Detektion nicht die "langsame" Ninhydrin-Reaktion, sondern die Reaktion mit Fluoren [R], einer Verbindung, die mit primären Aminogruppen starke Fluoreszenz im Sichtbaren ergibt, so gelingt die Trennung von 16 Aminosäuren in 2 Stunden [68]. Dagegen dauert die Aminosäureanalyse mit der herkömmlichen Ionenaustauscher-Chromatographie 20 Stunden.

Mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Verteilungs-Chromatographie werden Derivate von Aminosäuren z.B. die beim Edman-Abbau von Peptiden entstehenden Phenylthiohydantoine (1) [69] oder die Dansyl-aminosäuren (58) [70] erfolgreich getrennt.



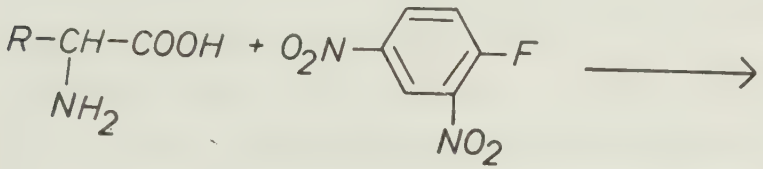
1

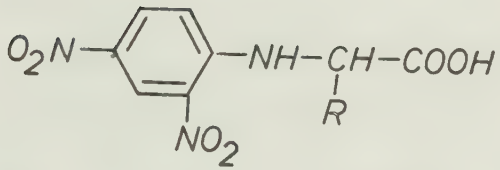


58

Ich versuchte nun, die HPLC zur Trennung von Aminosäuren als 2,4-Dinitrophenylderivate einzusetzen. Die 2,4-Dinitrophenyl-aminosäuren (59) werden durch Umsetzung der freien Aminosäuren mit 2,4-Dinitrofluorbenzol in Natriumcarbonat-alkalischer Lösung hergestellt [71]. Die Reaktion verläuft mit sehr guten

Ausbeuten. Durch die Einführung des substituierten Benzolrings können diese Aminosäurederivate mit Hilfe eines UV-Detektors nachgewiesen werden.





59

Die besten Trennergebnisse erzielte ich bei Anwendung einer ETH-Säule. Siloxanäther bilden in dieser Säule eine mittelpolare stationäre Phase. Die Elution der 2,4-Dinitrophenylaminosäuren erfolgte mit einem Gemisch aus n-Hexan, Isopropanol und Wasser (Abb. 26).

Die Derivate der monofunktionellen Aminosäuren haben unter diesen Bedingungen eine kurze Retentionszeit, während die der polareren Aminosäuren länger zurückgehalten werden. Erhöht man die Polarität der mobilen Phase, so werden die unpolaren Derivate in der Nähe des Inertpeaks eluiert. Die Auftrennung dieser Substanzen wird dabei schlechter. Bei geringerer Polarität des Elutionsmittels werden die polareren

2,4-Dinitrophenylaminosäuren zu lange auf der Säule zurückgehalten.

Einige technische Mängel an dem zur Zeit der Untersuchungen verfügbaren Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen sowie das Fehlen eines Gradienten veranlaßten mich, die Versuche zur Trennung von 2,4-Dinitrophenylaminosäuren mittels HPLC abzubrechen. Die Fortsetzung der Untersuchungen mit einem neuen Gerät scheint lohnend, zumal die Herstellung der Derivate einfach ist.

Zahllose Literaturbeispiele zeigen, daß die HPLC bereits universell eingesetzt werden kann, sowohl für quantitativ-analytische Probleme als auch für quantitative Bestimmungen.

In der Lebensmittelanalytik findet die HPLC unter anderem bei der Bestimmung von Vitaminen [72], biogenen Aminen [73] und Pflanzeninhaltsstoffen [74] Anwendung. Ein ganz aktuelles Anwendungsgebiet liegt in der Rückstandsanalytik [75], wo Insektizide und Herbizide bereits routinemäßig durch HPLC nachgewiesen werden.

Der HPLC sind grundsätzlich die gleichen Substanzen zugänglich wie der herkömmlichen Säulenchromatographie und der Dünnschichtchromatographie. Dabei wird erkennbar, daß sie prinzipiell der Gaschromatographie überlegen ist. Zur Gaschromatographie müssen die Proben in einem bestimmten Temperaturintervall unzersetzt verdampfbar sein. Bisweilen läßt sich diese Forderung durch Derivatisierung erfüllen. Das Hauptkriterium für die Anwendung der HPLC ist nur die Löslichkeit in einem der vielen Lösungsmittel oder deren Gemischen. Während mit

der Gaschromatographie etwa ein Sechstel aller bekannten chemischen Verbindungen erfaßt wird, ist der Anteil bei der HPLC mindestens viermal größer. Die Erfaßungsgrenze in der Gaschromatographie liegt allerdings aufgrund geeigneter Detektoren 3-4 Zehnerpotenzen tiefer als bei der HPLC.

Ein Vergleich dieser zwei Verfahren zeigt, daß beide dem anderen gegenüber Vorteile aufweisen. Sie werden in Zukunft nebeneinander zur Lösung unterschiedlicher Probleme herangezogen werden. Die HPLC dient in erster Linie zur Trennung von Substanzen, die thermisch labil sind, nicht verdampfbar sind oder ein hohes Molekulargewicht haben. In vielen Fällen, wo beide Verfahren gleich gute Trennungen liefern, wird man aufgrund besserer Auflösung, höherer Empfindlichkeit und des niedrigeren Preises der Gaschromatographie den Vorzug geben.

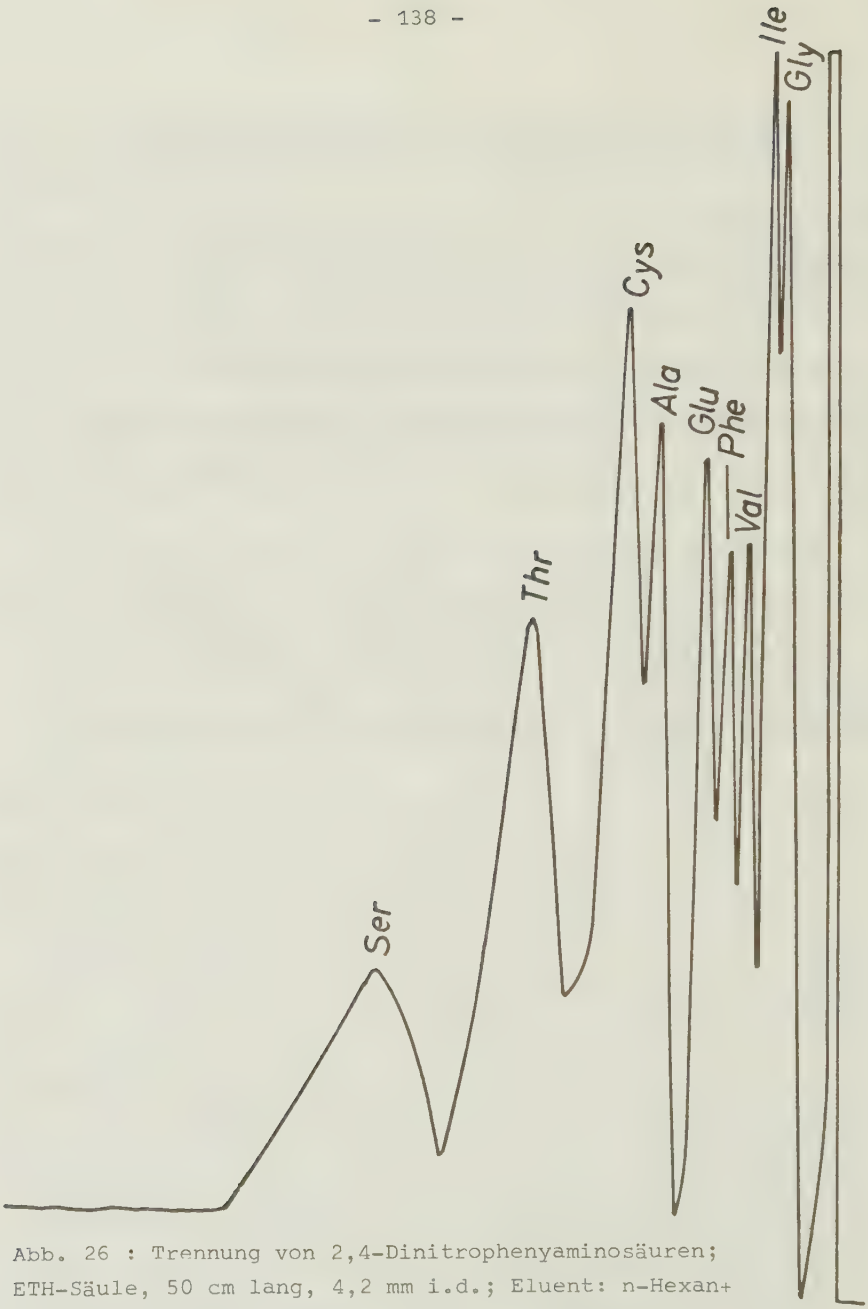


Abb. 26 : Trennung von 2,4-Dinitrophenyaminosäuren; ETH-Säule, 50 cm lang, 4,2 mm i.d.; Eluent: n-Hexan+ i-Propanol + Wasser (200+144+12); Druck 2000 psi.

X. Zusammenfassung und Diskussion

Bei Arbeiten über Umsetzungen in erhitzten Lebensmitteln wurde in unserem Arbeitskreis ein einfaches Verfahren zur Umwandlung von Aminosäuren bzw. ihrer Reaktionsprodukte mit Zuckern in leicht flüchtige Derivate gesucht.

Ziel dieser Arbeit war es, eine solche Methode auszuarbeiten und anzuwenden. Die aus der organischen Chemie bekannte Methylierung von Aminen mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid wurde zur Umsetzung von Aminosäureestern zu N,N-Dimethylderivaten eingesetzt und die so erhaltenen Verbindungen gaschromatographisch getrennt. Im Vergleich zu den häufig eingesetzten N-Acylderivaten von Aminosäuren weisen die N,N-Dimethylaminosäureester eine höhere Flüchtigkeit auf.

Einige Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen im Molekül wie Cystein, Serin, Threonin, Tyrosin und Hydroxyprolin können auf diese Weise nicht in genügend flüchtige Verbindungen übergeführt werden. Erst nach zusätzlicher Acetylierung bzw. Silylierung werden auch diese Aminosäuren gaschromatographierbar.

Im Histidin wird der heterocyclische Ring bei der Methylierung nicht angegriffen. Acetylierung und Silylierung des Imidazolrings verlaufen unvollständig, so daß Histidin mit dem erarbeiteten Verfahren nicht befriedigend erfaßt wird.

Tryptophan blieb bei den Untersuchungen unberücksichtigt, da sich diese Aminosäure bei saurer Hydrolyse von Proteinen zersetzt. Unbefriedigende Ergebnisse wurden auch bei Arginin

erhalten.

Die zuletzt genannten Aminosäuren werfen auch bei der Bestimmung mit anderen gaschromatographischen Methoden, etwa bei der Analyse als N-Trifluoracetylderivate, Probleme auf, die bisher noch nicht gelöst werden konnten.

Die Leistungsfähigkeit der ausgearbeiteten Methode zeigte sich beim Vergleich mit der gaschromatographischen Bestimmung von Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester. Bei der Untersuchung von Liebigs Fleischextrakt stellte ich eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Verfahren fest. Während die Herstellung der N-Trifluoracetylaminosäureester in zwei Reaktionsschritten erfolgt, sind zur Überführung der Aminosäuren in die N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäureester drei Reaktionsschritte notwendig. Dadurch ist diese Derivatisierung aufwendiger. Vorteile bietet sie gegenüber der von Gehrke publizierten N-Trifluoracetylierung bei der Analyse von Aminosäuren in komplexen Gemischen, etwa in Lebensmitteln. Die Methylierung erfolgt in wässriger Lösung, während die Derivatisierung nach Gehrke unter Wasserausschluß vor sich geht. Durch das Ausschütteln der N,N-Dimethylderivate mit Methylenchlorid aus der wässrigen Reaktionslösung erreicht man einen gewissen Reinigungseffekt. Bei routinemäßigen Aminosäure-Analysen in Lebensmitteln werden die Aminosäuren mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie angereichert und von den übrigen Bestandteilen abgetrennt. Damit wird verhindert, daß im Gaschromatogramm Peaks auftreten, die nicht von Aminosäuren herrühren. Außerdem werden schwerflüchtige

Substanzen entfernt, die die GC-Säulen verschmutzen können. Diese zeitraubende Reinigung mit Ionenaustauscher kann unter Umständen bei der Aminosäurederivatisierung durch Methylierung unterbleiben.

Das in dieser Arbeit entwickelte Analysenverfahren bewährte sich bei der Untersuchung verschiedener Lebensmittel. Im einzelnen wurden die Aminosäuren in Fleisch, Fleischextrakt, Suppen, Soßen, Käse und Krabbenextrakt bestimmt.

Bei der Analyse von Reaktionsprodukten reduzierender Zucker mit Lysin setzte ich die beschriebene Methode der Methylierung ein. So konnte ich im Reaktionsgemisch von Lysin und Isomaltol das ε-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-Lysin (51) nachweisen. Da die Substanz nur in geringer Menge entsteht und sie aufgrund ihrer polaren Struktur schwerflüchtig ist, gestaltete sich die Isolierung schwierig. Durch Veresterung der Carboxylgruppe mit methanolischer HCl und anschließender Methylierung mit Formaldehyd / Natriumcyanborhydrid wurde der lipophile Charakter der Verbindung erhöht. Sie konnte nach der Methylierung mit Methylenchlorid extrahiert und über präparative Schichtchromatographie gereinigt werden. Ihre Identifizierung erfolgte über die Spektren. Hierbei erwies sich die Methylierung als günstig, da sie die Interpretation der verschiedenen Spektren erleichtert. Bei größeren Schutzgruppen kann beispielsweise das Massenspektrum durch den Zerfall der Schutzgruppe geprägt sein, während die Fragmentierung des Grundkörpers in den Hintergrund tritt.

Ein Teil meiner Arbeit befaßt sich mit der Anwendung einer

neueren analytischen Methode, der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, auf die Bestimmung von Aminosäuren. Nach Umsetzung der Aminosäuren mit 2,4-Dinitrofluorbenzol können sie mit einem UV-Detektor erfaßt werden. Trotz einiger technischer Mängel an dem zur Zeit der Untersuchungen zur Verfügung stehenden Gerät konnten 9 Aminosäurederivate getrennt werden. Vorteile bietet diese Methode durch die hohe Schnelligkeit, mit der die Analysen durchgeführt werden können.

XI. Literaturverzeichnis

1) F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945); 40, 261 (1946).

2) P. Edman, Acta Chem. Scand. 4, 277, 283 (1950).

3) S. Moore, W.H. Stein, J. biolog. Chemistry 192, 663 (1951); 211, 893 (1954).

D.H. Spackmann, W.H. Stein, S.Moore, Analyt. Chemistry 30, 1190 (1958).

4) F. Drawert, W. Heimann, K. Rolle, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 144, 237 (1970).

5) J. Rasić, T. Stojsavleric, R. Curcic, Milchwissenschaft 26, 219 (1971).

6) H. Trommsdorff, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 147, 133 (1971).

7) R. Ten Broeke, J.P. Goddijn, N. Gorin, G.P. Schütz, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 145, 335 (1971).

8) B. Weinstein, A.H. Fenselau, J. Chromatogr. 15, 149 (1964).

9) J. Wagner, G. Rauch, Z. Anal. Chem. 194, 350 (1963).

10) N. Melamed, M. Renard, J. Chromatogr. 4, 339 (1960).

11) A. Zlatkis, J.F. Oro, A.P. Kimbal, Anal. Chem. 32, 162 (1960).

12) H. Giacobbo, W. Simon, Pharm. Acta Helv. 39, 162 (1964).
M.V. Stack, Biochem. J. 96, 56 P (1965).

13) J.J. Pisano, W.J.A. VandenHeuvel, E.C. Horning, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 82 (1962).

M.R. Guerin, W.O. Shults, J. Chromatogr. Sci. 7, 701 (1969).

14) J.W. Westley, V.A. Close, D.N. Nitecki, B. Halpern, Anal. Chem. 40, 1888 (1968).

15) S. Coussement, M. Renard, J.I.S.I.C., Chromatography and Methods of Immediate Separation, Association of Greek Chemists, p. 151, Athen 1966.

16) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König, Angew. Chem. 75, 282 (1963).

17) F. Weygand, K. Burger, K. Engelhardt, Chem. Berichte 99, 1461 (1966).

18) E. Bayer, K.H. Reuther, F. Born, Angew. Chem. 69, 640 (1957).

19) J.R. Coulter, C.S. Hann, J. Chromatogr. 36, 42 (1968).

20) F.E. Kaiser, C.W. Gehrke, R.W. Zumwalt, K.C. Kuo, J. Chromatogr. 94, 113 (1974).
C.W. Gehrke, K. Kuo, R.W. Zumwalt, J. Chromatogr. 57, 209 (1971)
K.R. Leimer, R.H. Rice, C.W. Gehrke, J. Chromatogr. 141, 121 (1977).

21) C.W. Gehrke, W.M. Lamkin, D.L. Stalling, F. Shahrokhi, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 328 (1965).

22) J. Jönsson, J. Eyem, J. Sjöquist, Anal. Biochem. 51, 204 (1973).

23) D. Roach, C.W. Gehrke, R.W.Zumwalt, J. Chromatogr. 43, 311 (1969).

24) C.W. Gehrke, R.W. Zumwalt, K.C. Kuo, J. Chromatogr. 55, 267 (1971).

25) R.J. Siezen, T.H. Mague, J. Chromatogr. 130, 151 (1977). A.J. Cliffe, N.J. Berridge, D.R. Westgarth, J. Chromatogr. 78, 333 (1973).

26) C.W. Moss, M.A. Lambert, F.J. Diaz, J. Chromatogr. 60, 134 (1971).

27) B. Halpern, J. Ricks, J.W. Westley, Anal. Biochem. 14, 156 (1966).

28) L. Mac Kenzie, L.R. Hogge, J. Chromatogr. 132, 485 (1977).

29) K. Rühlmann, W. Giesecke, Angew. Chem. 73, 113 (1961).

30) J.F. Klebe, H. Finkbeiner, D.M. White, J. Am. Soc. 88, 3390 (1966).

31) C.W. Gehrke, H. Nakamoto, R.W. Zumwalt, J. Chromatogr. 45, 24 (1969).

32) E.D. Smith, H. Sheppard jr., Nature 208, 878 (1965).

33) J.P. Thenot, E.C. Horning, Anal. Lett. 5, 519 (1972).

34) R.F. Borch, M.D. Bernstein, H.D. Durst, J. Amer. Soc. 93, 2897 (1976).

35) R.E. Bowman, J. Chem. Soc., 1349 (1950).

36) Th. Wieland, in: Houben-Weyl, Eugen Müller (Hrsg.), Methoden der organ. Chemie, Bd. II/III, S. 328, 4. Aufl.

37) Y. Watanabe, S. Shim, T. Mitsudo, M. Yamashita, Y. Takegamie, Bull. Chem. Soc. Jap. 49, 1378 (1976).

38) C.W. Gehrke, K. Leimer, J. Chromatogr. 57, 219 (1971).

39) Ernst Lindner, Toxikologie der Lebensmittel, S. 49, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

40) W.J.A. VandenHeuvel, J. Chromatogr. 36, 354 (1968).

41) K. Heyns, H.F. Grützmacher, Fortschr. Chem. Forsch. 6, 536 (1966).

42) J.H. Jones, Quart. Rev. 22, 302 (1968).

43) F. Weygand, A. Prox, H.H. Fessel, K.K. Sun, Z. Naturforsch. B 20, 1169 (1965).

K. Biemann, J. Seibl, F. Gapp, J. Am. Chem. Soc. 83, 3795 (1961).

A. Prox, K.K. Sun, Z. Naturforsch. B 21, 1028 (1966).

44) W. Baltes, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 135, 319 (1968).

W. Baltes, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 136, 69 (1968).

45) R. Kaiser, A. Prox, in H.C. Beyermann, A. v. de Linde, W. Maassen van den Brink, Peptides, North Holland Publishing Co., p. 158, Amsterdam 1967.

46) H. Nau, J. Chromatogr. 121, 376 (1976).

47) H. Böhme, A. Dick, G. Driesen, Chem. Ber. 94, 1879 (1961).

48) W. Baltes, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 135, 319 (1967).

49) H. Sulser, P. Schenk, W. Büchi, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 58, 157 (1967 a).

50) F. Weygand, E. Csendes, Angew. Chem. 64, 136 (1952).

51) C.W. Gehrke, H. Takeda, J. Chromatogr. 76, 63 (1973).

52) M. Stefanovic, B.L. Walker, Anal. Chem. 39, 710 (1967).

53) D. Roach, C.W. Gehrke, J. Chromatogr. 43, 303 (1969).

54) D. Roach, C.W. Gehrke, J. Chromatogr. 50, 393 (1970).

55) D. Roach, C.W. Gehrke, J. Chromatogr. 50, 393 (1970).

56) H. Sulser, Die Extraktstoffe des Fleisches, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1978, S. 11.

57) Lit. 56).

58) Th. Severin, A. Loidl, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 161, 119 (1976).

59) Th. Severin, A. Loidl, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 161, 119 (1976).

60) H. Sulser, W. Büchi, Lebensm.-Wiss. und Technol. 2, 105 (1965).

K. Heyns, J. Heukeshoven, K.H. Brose, Angew. Chem. 80, 627 (1968).

P.A. Finot, R. Viani, J. Bricot, J. Mauron, Experientia 25, 134 (1969).

61) A. Loidl, Dissertation München 1976.

62) A.R. Katritzky, A.P. Ambler, "Physical Methods in Heterocyclic Chemistry", Vol. II, Academic Press New York 1963,

p. 259.

63) A. Loidl, Dissertation München 1976.

64) K. Heyns, G. Vogelsang, Chem. Berichte 87, 13 (1954).

65) The Aldrich Library of NMR Spectra, Vol. II, 12,710-8 (1974).

66) Th. Severin, A. Loidl, Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 161, 119 (1976).

67) S. Udenfried, S. Stein, Science 178, 871 (1972).

68) J.R. Benson, Durrum Resin Report No. 6, Dezember 1973.

69) G. Frank, W. Strubert, Chromatographia 6, 522 (1973).

A.S. Bhown, J. Mole, A. Weissinger, J.C. Bennett, J. Chromatogr. 148, 532 (1978).

M.N. Margolis, A. Brauer, J. Chromatogr. 148, 429 (1978).

70) P.R. Brown, High Pressure Liquid Chromatography, Biochemical and Biomedical Application, Academic Press 1973.

71) A.L. Levy, D. Chung, Am. Soc. 77, 2899 (1955).

72) K. Unger, D. Nyamah, Chromatographia 7, 63 (1974).

R.C. Williams, D.R. Baker, J.A. Schmit, J. Chromatog. Sci. 11, 618 (1973).

73) B.A. Persson, B.L. Karger, J. Chromatog. Sci. 12, 521 (1974).

E. Roder, J. Merzhäuser, Z. Anal. Chem. 272, 34 (1974).

C.-H. Chu, D.J. Pietzryk, Anal. Chem. 46, 330 (1974).

74) H.F. Murgia, P. Richards, H.F. Walton, J. Chromatogr. 87, 523 (1973).

75) R.P.W. Scott, P. Kucera, J. Chromatogr. 83, 257 (1973).

Waters Ass., Chromatogr. Notes 3 und 4.

Experimenteller Teil

A. Herstellung und gaschromatographische Trennung von N,N-Dimethylaminosäurebutylestern

1. 1 g einer Aminosäure oder eines Aminosäuregemisches wird mit 100 ml 3 N HCl in n-Butanol (oder Methanol) 30 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Man dampft anschließend i. Vak. zur Trockene ein, nimmt den Rückstand mit 10 ml Wasser auf und fügt 9 ml Formaldehyd (40% in Wasser) hinzu. Diese Lösung wird langsam zu 1,1 g Natriumcyanoborhydrid gegeben und der pH-Wert des Gemisches mit Essigsäure auf 7 eingestellt. Man läßt 30 min stehen, versetzt bis zur alkalischen Reaktion mit Natronlauge und extrahiert die Lösung mehrmals mit je 20 ml Methylenchlorid. Die vereinigten Methylenchloridextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend i. Vak. auf 2-3 ml eingeengt. Diese Lösung wird in den Gaschromatographen eingespritzt.

2. Gaschromatographische Bedingungen :

Gerät : Varian Aerograph Series 2800
Flammenionisations-Detektor

Injektor-Temp. 220°C Detektor-Temp. 220°C

Trägergas (Stickstoff) 25 ml/min

Luft 300 ml/min

Wasserstoff 30 ml/min

Säulen : 5% OV 17 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2 m x 1/8".

2,5% SP 1000 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 1,8 m x 1/8".

Gaschromatogramme siehe Abb. 1 und Abb. 2.

B. Herstellung und gaschromatographische Trennung von O(S)-Acetyl-N,N-dimethylaminosäurebutylestern

1. 1 g einer Aminosäure oder eines Aminosäuregemisches wird wie unter A.1. beschrieben in N,N-Dimethylaminosäureester übergeführt. Die erhaltene Methylenchloridphase wird nach dem Einengen mit 100 ml wasserfreiem Methylenchlorid versetzt. Durch erneutes Einengen der Lösung auf 2-3 ml destilliert man Wasserreste azeotrop ab. Der Rückstand wird mit 3 ml eines Gemisches aus Pyridin und Acetanhydrid (4:1) versetzt. Man schüttelt kräftig, läßt 5 min stehen und gaschromatographiert.

2. Gaschromatographische Bedingungen :

wie unter A.2. beschrieben

Säulen : 5% SE 30 auf 60-80 mesh Chromosorb W AW DMCS, 4 m x 1/8".

2,5% SP 1000 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 1,8 m x 1/8".

5% Apiezon M auf 80-100 mesh Chromosorb W AW, 2 m x 1/8".

Gaschromatogramme siehe Abb. 3, Abb. 4 und Abb. 5.

C. Herstellung und gaschromatographische Trennung von N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilyl-aminosäurebutylestern

1. 500 mg einer Aminosäure oder eines Aminosäuregemisches werden entsprechend der unter A.1. angeführten Vorschrift zu N,N-Dimethylaminosäureestern umgesetzt. Den Methylenchloridextrakt dampft man nach dem Trocknen über Natriumsulfat ein. Der Rückstand wird mit 50 ml wasserfreiem Methylenchlorid aufgenommen und das Lösungsmittel erneut i. Vak. entfernt. Den Eindampfrückstand löst man in 2 ml Acetonitril und silyliert mit 3 ml N,N-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA). Dazu wird das Reaktionsgemisch in einem geschlossenen Derivatisiergefäß 30 min auf 150°C erhitzt (Ölbad). Die Reaktionslösung wird nach dem Erkalten gaschromatographisch untersucht.

2. Gaschromatographische Bedingungen :

wie unter A.2. beschrieben

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 6.

D. Herstellung der N,N-Dimethylderivate von biogenen Aminen

1. Eine Lösung von 7 mmol Amin (oder von ca. 1 g eines Amingemisches) und 6 ml Formaldehyd (40% in Wasser) in 30 ml Wasser werden zu 1,5 g Natriumcyanoborhydrid gegeben. Mit Essigsäure stellt man den pH-Wert auf ca. 7 ein und läßt das Reaktionsgemisch 30 min unter Rühren stehen. Anschließend wird die Lösung bis zur alkalischen Reaktion mit Natronlauge versetzt und dann erschöpfend mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte trocknet man über Natriumsulfat und engt sie dann auf ca. 5 ml ein. Diese Lösung wird dann direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

2. Gaschromatographische Bedingungen :

wie unter A.2. beschrieben.

Säule : 5% SE 30 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 7.

E. Derivatisierung von Dipeptiden mit Formaldehyd / Natrium-cyanoborhydrid

1. 500 mg Peptid werden mit 50 ml 3 N HCl in Methanol 30 min unter Rückfluß erhitzt. Man dampft i. Vak. zur Trockene ein, nimmt den Rückstand mit 5 ml Wasser auf und versetzt mit 4 ml Formaldehyd (40% in Wasser). Diese Lösung wird langsam zu 0,5 g Natriumcyanoborhydrid gegeben und der pH-Wert mit Essigsäure auf 7 eingestellt. Man läßt 30 min stehen, macht mit Natronlauge alkalisch und extrahiert dann die Lösung mehrmals mit je 10 ml Methylenchlorid. Die vereinigten Methylenchloridextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend i. Vak. eingeengt (auf 2-3 ml).

   Sind im Peptid Aminosäuren mit HO- und HS-Gruppen gebunden, so kann entsprechend der unter C.1. angegebenen Vorschrift silyliert werden.

   Die so derivatisierten Peptide sind gaschromatographisch erfaßbar.

F. Aminosäureanalyse in Lebensmitteln

1. Untersuchung von Liebigs Fleischextrakt

a) ohne Hydrolyse

10 g Fleischextrakt werden bis zur Lösung mit heißem Wasser versetzt. Nach dem Erkalten extrahiert man 4 h mit Methylenchlorid. Dann wird die organische Phase i. Vak. zur Trockene eingeengt.

1. Analyse der Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester

Zu 500 mg des Eindampfrückstandes nach a) gibt man 50 ml 3 N HCl in n-Butanol und erhitzt 30 min unter Rückfluß. Die Reaktionslösung wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand mit 3 ml Methylenchlorid und mit 3 ml Trifluoracetanhydrid versetzt. Nach dem Durchmischen erhitzt man 5 min im geschlossenen Derivatisiergefäß auf 150°C. Die abgekühlte Lösung wird direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Gaschromatographische Bedingungen :

Gerät : Hewlett Packard Gas Chromatograph 5830 A
Flammenionisations-Detektor

Injektor-Temp. 250°C Detektor-Temp. 250°C

Trägergas (Stickstoff) 25 ml/min

Luft 300 ml/min

Wasserstoff 30 ml/min

Säulen : 2,5% OV 17 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2 m x 1/8".

3% OV 210 auf 80-100 mesh Chromosorb W HP, 4 m x 1/8".

Gaschromatogramme siehe Abb. 8 und Abb. 9.

2. Analyse der Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester

500 mg des Eindampfrückstandes nach a) werden wie unter C.1. angegeben behandelt.

Gaschromatographische Bedingungen :

wie unter F.1.a)1. beschrieben

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 10.

b. nach der Hydrolyse

10 g Probe werden mit 1000 ml wässriger 6 N HCl hydrolysiert. Dazu erhitzt man die Reaktionslösung 24 h in N_2-Atmosphäre unter Rückfluß. Das erkaltete Hydrolysat wird neutralisiert, filtriert und i. Vak. zur Trockene eingedampft.

1. Analyse der Aminosäuren als N-Trifluoracetylbutylester

500 mg des Rückstandes nach b) werden wie unter F.1.a)1. beschrieben, behandelt und der gaschromatographischen Analyse unterworfen.

Gaschromatographische Bedingungen :

wie unter F.1.a)1. angegeben.

Säulen : 2,5% OV 17 auf 80-100 mesh Chromosorb G AW DMCS, 2 m x 1/8".

3% OV 210 auf 80-100 mesh Chromosorb W HP, 4 m x 1/8".

Gaschromatogramme siehe Abb. 11 und Abb. 12.

2. Analyse der Aminosäuren als N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester

500 mg des Rückstandes nach b) werden nach C.1. umgesetzt und gaschromatographisch untersucht.

Gaschromatographische Bedingungen :
wie unter F.1.a)1. angegeben

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 13.

2. Untersuchung einer flüssigen Würze

50 ml der flüssigen Würze werden erschöpfend mit Methylenchlorid ausgezogen. Die wässrige Phase engt man i. Vak. zur Trockene ein. Mit 1 g des Rückstandes wird die unter C.1. beschriebene Derivatisierung durchgeführt.

Gaschromatographische Bedingungen :
wie unter F.1.a) beschrieben

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 14.

3. Untersuchung von gekörnter Brühe

20 g gekörnte Brühe werden in 200 ml heißem Wasser gelöst. Die abgekühlte Brühe wird dann 4 h mit Methylenchlorid extrahiert. Die wässrige Phase dampft man i. Vak. zur Trockene ein und führt mit 1 g des Rückstandes eine Umsetzung der Aminosäuren nach C.1. durch.

Gaschromatographische Bedingungen :
wie unter F.1.a) beschrieben.

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS,
2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 15.

4. Untersuchung von klarer Fleischsuppe

a) Untersuchung eines Handelsproduktes

Man löst einen Würfel klare Fleischsuppe nach Gebrauchsanweisung in heißem Wasser. Die Suppe wird nach dem Erkalten durch Extraktion mit Methylenchlorid von lipophilen Bestandteilen befreit. Die wässrige Lösung engt man ein und im trockenen Rückstand führt man eine Aminosäurederivatisierung durch. Dazu behandelt man 1 g des Rückstandes wie in C.1. beschrieben.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS,
2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 16.

b) Untersuchung einer mit Rindfleisch hergestellten Fleischsuppe

500 g Rindfleisch (Bruststück) werden 1,5 h mit Wasser gekocht. Zum Entfetten extrahiert man die Suppe 4 h mit Methylenchlorid und engt dann i. Vak. zur Trockene ein. 1 g dieses Rückstandes wird nach C.1. weiterbehandelt.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 17.

5. Untersuchung von Hühnersuppe

Die Suppe wird filtriert und anschließend 4 h mit Methylenchlorid extrahiert. Die wässrige Phase dampft man ein und untersucht 1 g des Rückstandes auf Aminosäuren wie unter C.1. beschrieben.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 18.

6. Untersuchung von Champignon-Creme-Suppe

Die pulvrige Suppenzubereitung wird in Wasser gelöst und dann durch Methylenchlorid-Extraktion entfettet. Das Wasser wird i. Vak. abdestilliert. 1 g des Rückstandes wird nach

C.1. zur Umsetzung der Aminosäuren behandelt.

Gaschromatographische Bedingungen : wie unter F.1.a)

5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 19.

7. Untersuchung von Bratensoßen

a) Die untersuchten Handelsprodukte "Soße zum Rinderaten", "Soße zum Braten" und "Klarer Bratensaft" werden wie auf den Packungen angegeben in Wasser gelöst. Zur Entfettung extrahiert man die Soßen mit Methylenchlorid. Die wässrige Phase wird zur Trockene eingeengt und 1 g des Rückstandes nach C.1. umgesetzt.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 20.

b) Untersuchung einer selbst hergestellten Rinderbratensoße

Rindfleisch wird in heißem Pflanzenfett von allen Seiten angebraten. Dann gibt man vom Topfrand her heißes Wasser zu und läßt das Fleisch ca. 1 h schmoren. Die erhaltene Soße wird filtriert, entfettet und wie die Handelsprodukte auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin untersucht.

Gaschromatogramm siehe Abb. 21.

8. Untersuchung von Rindfleisch

a) rohes Rindfleisch

12,5 g rohes Rindfleisch werden zerkleinert und im Perforator 12 h mit Methylenchlorid entfettet. Der Rückstand wird 24 h einer Hydrolyse unter N_2-Atmosphäre unterworfen (Rückstand + 1200 ml wässr. 6 N HCl unter Rückfluß erhitzen). Man neutralisiert das Hydrolysat, filtriert und destilliert i. Vak. das Wasser ab. Zur Veresterung wird mit 3 N HCl in Methanol umgesetzt. Anschließend engt man die Lösung zur Trockene ein. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen und mit 25 ml Formaldehyd (40% in Wasser) versetzt. Diese Lösung gibt man zu 3,2 g Natriumcyanoborhydrid. Man stellt den pH-Wert auf 7 ein und läßt das Gemisch 30 min reagieren. Dann wird mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt und mit Methylenchlorid extrahiert. Der Methylenchloridauszug wird auf 250 ml eingeengt. Hiervon dampft man 25 ml zur Trockene ein und unterwirft den Rückstand einer Silylierung nach C.1.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Als Standard für die gaschromatographische Untersuchung wurden 727 mg Palmitinsäurebutylester mit Methylenchlorid zu 100 ml gelöst. 4 µl der Probenlösung und 6 µl der Standardlösung wurden eingespritzt.

Gaschromatogramm siehe Abb. 22.

b) gebratenes Rindfleisch

12,5 g rohes Rindfleisch werden in hauchdünne Scheiben geschnitten und in heißem Pflanzenfett dunkelbraun gebraten. Nach dem Zerkleinern und Entfetten mit Methylenchlorid hydrolysiert man die Probe.

Hydrolyse der Probe sowie die Derivatisierung der Aminosäuren erfolgen nach den unter F.8.a) ausgeführten Vorschriften.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Es werden 4 µl Probenlösung und 6 µl Standardlösung eingespritzt.

Gaschromatogramm siehe Abb. 23.

9. Untersuchung von Parmesan-Käse

5 g Parmesan-Käse werden 4 h mit Methylenchlorid extrahiert. Der entfettete Rückstand wird zur Derivatisierung der Aminosäuren nach der in C.1. angegebenen Vorschrift umgesetzt.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 24.

10. Untersuchung von Krabbenextrakt

500 g tiefgefrorene Krabben werden nach dem Auftauen 2 h in Wasser gekocht. Diese wässrige Lösung engt man i. Vak. auf ca. 150 ml ein und extrahiert dann 4 h im Perforator mit Methylenchlorid. Die wässrige Phase wird zur Trockene eingedampft. 1 g des Rückstandes wird zur Überführung der Aminosäuren in die N,N-Dimethyl-O(S)-trimethylsilylbutylester wie unter C.1. angegeben behandelt.

Gaschromatographische Bedingungen : wie in F.1.a)

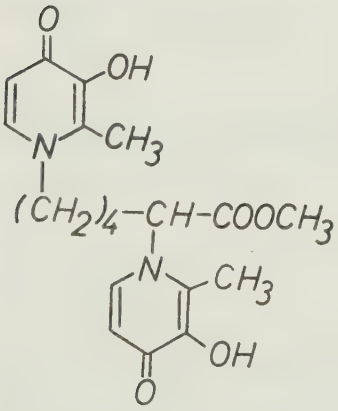
Säule : 5% SE 52 auf 100-120 mesh Chromosorb W AW DMCS, 2,5 m x 1/8".

Gaschromatogramm siehe Abb. 25.

G. Umsetzung von Isomaltol mit Lysin

2,5 g Isomaltol und 2,9 g Lysin werden in 50 ml Wasser unter Rückfluß zum Sieden erhitzt.(5 h). Die erkaltete Lösung extrahiert man 8-10 h im Perforator mit Methylenchlorid. Aus diesem Extrakt läßt sich nicht umgesetztes Isomaltol zurückgewinnen. Die wässrige Phase wird i. Vak. zur Trockene eingedampft und der Rückstand 30 min mit 3 N HCl in Methanol unter Rückfluß erhitzt. Nach Einengen der erkalteten Lösung zur Trockene nimmt man den Rückstand mit Wasser auf, neutralisiert mit Natronlauge und unterwirft die wässrige Lösung (= Lösung I) einer Extraktion mit Methylenchlorid.

1. Isolierung von α,ε-N-Bis-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)-Lysinmethylester (53)



Die nach vorstehender Vorschrift erhaltene organische Phase wird chromatographiert (PSC-Fertigplatten Kieselgel F 254, MERCK, 2mm Schichtdicke, Laufmittel: Benzol/

Methanol (1:1)). Eine Zone mit R_f=0,5 gibt mit $FeCl_3$-Lösung eine tiefviolette Färbung. Diese Zone wird mit Methanol eluiert, das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft und der Rückstand mit Methylenchlorid versetzt. Nach Filtrieren der Lösung engt man erneut zur Trockene ein. Die Substanz 53 fällt kristallin an.

Aus Äthylacetat hellgelbe Kristalle, Schmp. 120°C

$C_{19}H_{24}N_2O_6$ (376,38) Ber. C 60,63 H 6,43 N 7,44
Gef. C 59,69 H 6,36 N 7,03

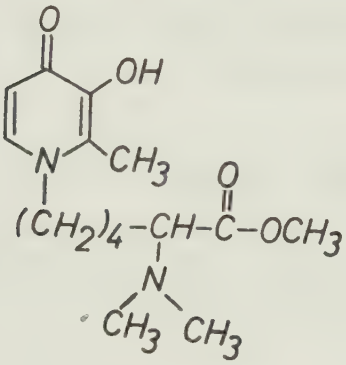
MS : m/e 376(20, M^+), 345(10), 317(5), 252(45), 193(10), 180(100), 179(9), 166(48), 138(59), 124(40), 110(60), 97(33), 96(40), 82(18)

IR (KBr) : 3180, 1740, 1630, 1570, 1520, 1240 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (CD_3OD) : δ = 1,30 (m), 2,40 (s), 3,50 (s), 6,40 (m) und 7,60 (m) ppm

UV (H_2O) : λ_{max} = 218 nm (log ε = 4,3), 283 nm (log ε = 4,2).

2. Isolierung von ε-N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridyl)- α-N,N-dimethyl-Lysinmethylester (54)



Die wässrige Lösung I, die man nach obiger Vorschrift erhält, versetzt man mit 20 ml Formaldehyd (40% in Wasser) und gibt sie dann langsam zu 2 g Natriumcyanoborhydrid. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird mit Essigsäure bei ca. 8 gehalten. Nach 30-minütigem Stehen unterwirft man die Lösung einer 8-stündigen Extraktion mit Methylenchlorid. Die eingeengte organische Phase wird auf PSC Fertigplatten Kieselgel F 254, MERCK, 2 mm Schichtdicke chromatographiert (Fließmittel : Benzol/Methanol 1:1). Beim Besprühen mit $FeCl_3$-Lösung färbt sich eine Zone violett. Sie wird mit Methanol eluiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand einer Hochvakuum-Destillation unterworfen. Bei 160°C (0,1 Torr) scheiden sich farblose Kristalle in der Vorlage ab.

Schmp. 96°C

$C_{15}H_{24}N_2O_4$ (296,34) Ber. C 60,79 H 8,16 N 9,45
Gef. C 60,35 H 7,62 N 9,41

MS : m/e 296(15,M^+), 252(83), 237(90), 180(20), 166(60), 152(95), 138(60), 124(74), 110(100), 97(22), 96(25)

IR (KBr) : 3180, 1630, 1570, 1520, 1240 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : δ = 1,20 (m), 2,35 (s), 2,40 (s), 3,75 (s), 6,40 (d, J=7,2 Hz), 7,60 (d, J=7,2 Hz) ppm.

UV (H_2O) : λ_{max} = 218 nm (log = 4,3), 283 nm (log = 4,2).

3. Methylierung von 54

1 g 54 wird in 30 ml Methanol suspendiert. Über einen Zeitraum von ca. 15 min versetzt man unter Rühren mit 1 g Diazomethan, gelöst in Äther. Danach wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand am Hochvakuum destilliert. Bei 120°C/0,1 Torr destilliert der O-Methyläther 57 über.

Die Substanz ist ein hellgelbes, hygroskopisches Öl.

$C_{16}H_{26}N_2O_4$ (310,37) Ber. C 61,91 H 8,44 N 9,02
Gef. C 61,57 H 8,22 N 8,90

MS : m/e 310(37,M^+), 266(100), 251(88), 194(32), 180(76), 166(92), 152(64), 138(89), 124(27), 110(95)

IR (KBr) : 1740, 1630, 1570, 1520, 1240 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) : = 1,30 (m), 2,40 (s), 3,50 (s), 3,90 (s), 6,40 (d, J=7,2 Hz), 7,60 (d, J=7,2 Hz) ppm.

H. Umsetzung von Isomaltol mit α-N-Acetyl-Lysin

2,5 g Isomaltol und 3,6 g α-N-Acetyl-Lysin werden in 50 ml Wasser 6 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das Wasser wird i. Vak. verdampft und der Rückstand mit 250 ml 3 N HCl in Methanol 30 min gekocht. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels löst man den Rückstand in Wasser, neutralisiert und extrahiert die Lösung 10 h mit Methylenchlorid. Dieser Extrakt wird chromatographiert (PSC-Fertigplatten Kieselgel F 254, MERCK, 2 mm Schichtdicke, Fließmittel : Benzol / Methanol 4:3). Beim Besprühen mit $FeCl_3$-Lösung tritt violette Färbung einer Zone auf (R_f=0,5). Diese Zone enthält α-N-Acetyl-ε-N-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1pyridyl)-Lysinmethylester 56. Nach Elution vom Kieselgel mit Methanol, Abdampfen des Lösungsmittels und nach einer HV-destillation liegt 56 rein vor. 56 ist ein farbloses Öl, das im Hochvakuum bei 150°C/0,1 Torr überdestilliert.

MS : m/e 310(47,M^+), 267(9), 251(10), 252(32), 180(100), 166(44), 152(75), 138(32), 124(62), 110(22), 97(25), 96(18).

I. Herstellung von 2,4-Dinitrophenyl-aminosäuren und ihre Trennung mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

1. 1 g Aminosäure wird mit 2 g Natriumhydrogencarbonat in 100 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 2 g 2,4-Dinitrofluorbenzol in Ethanol 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Den Alkohol destilliert man i. Vak. ab, schüttelt zur Entfernung von 2,4-Dinitrofluorbenzol mit Äther aus und säuert an. Die Dinitrophenylaminosäure wird mit Essigsäureethylester der wässrigen Phase entzogen. Das Aminosäurederivat fällt nach Abdestillieren des Lösungsmittels kristallin an.

1)	DNP- Glycin	Schmp. 204°C	(aus wässr. Methanol)
2)	DNP- Alanin	177°C	(aus Petroläther/Äther)
3)	DNP- Valin	132°C	(aus Petroläther/Äther)
4)	DNP- Isoleucin	114°C	(aus Petroläther/Äther)
5)	DNP- Serin	173°C	(aus wässr. Methanol)
6)	DNP- Threonin	145°C	(aus Petroläther/Äther)
7)	DNP- Glutaminsäure	135°C	(aus Essigsäureethylester/ Chloroform)
8)	DNP- Phenylalanin	189°C	(aus Petroläther/Äther)

2. HPLC-Bedingungen :

Gerät : Dupont 841 Liquid Chromatograph

Säule : ETH

Eluent : n-Hexan/i-Propanol/Wasser (200:144:12)

Druck : 2000 psi

Chromatogramm siehe Abb. 26.

Lebenslauf

Hildegard Popp-Ginsbach geb. Ginsbach	geboren am 28.6.1951 in Sehndorf als Tochter von Jakob Ginsbach und seiner Ehefrau Marta, geb. Weber, verehelicht im November 1975 mit Dr. Eugen Popp
Schulen	1957-1964 Volksschule in Borg 1964-1969 Aufbaugymnasium in Bliskastel
Reifeprüfung	Juni 1969
Berufsausbildung	WS 1969/70-WS 1974/75 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München
Vorprüfung	April 1972
Hauptprüfung Teil A	April 1974
Hauptprüfung Teil B	April 1975

Seit Oktober 1975 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Th. Severin am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München an der vorliegenden Dissertation.